

KCNQ1- ja *KCNE2*-geenien mahdollinen yhteys kasvuhormonin
liikaeritykseen: ituradan mutaatioiden etsintä somatotropinoomapotilailta

Anna-Pauliina Iivonen

Pro gradu –tutkielma
Helsingin yliopisto
Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta
Huhtikuu 2018

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution– Department Biotieteiden laitos	
Tekijä – Författare – Author Anna-Pauliina Iivonen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title KCNQ1- ja KCNE2-geenien mahdollinen yhteys kasvuhormonin liikaeritykseen: ituradan mutaatioiden etsintä somatotropinomapotilailta – Potential roles of <i>KCNQ1</i> and <i>KCNE2</i> genes in excessive growth hormone secretion: screening for germline mutations in somatotropinoma patients			
Oppiaine – Läroämne – Subject Biologia			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu	Aika – Datum – Month and year 05/2018	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 58	
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Recently, our group reported that mutations in <i>KCNQ1</i>, a potassium channel gene usually linked to long QT syndrome, cause growth hormone deficiency and maternally inherited gingival fibromatosis. Expression of the mutated <i>KCNQ1</i> with <i>KCNE2</i> subunit was shown to reduce pituitary hormone secretion in functional experiments in the original study. The aim of this thesis was to investigate if germline mutations in <i>KCNQ1</i> and <i>KCNE2</i>, a gene encoding an auxiliary potassium channel subunit, could also play a role in the opposite phenomenon, growth hormone excess. Growth hormone (GH) excess causes acromegaly, a condition that is typically due to a GH secreting pituitary adenoma. I screened <i>KCNQ1</i> and <i>KCNE2</i> for germline mutations in 45 acromegaly patients by Sanger sequencing and predicted effects of the mutations on protein function by <i>in silico</i> tools. Only deep intronic and synonymous polymorphisms were detected in <i>KCNQ1</i>. These findings were likely insignificant based on the <i>in silico</i> predictions and the variants' frequencies in the general population. In <i>KCNE2</i>, a heterozygous c.22A>G, p.(Thr8Ala) mutation with an unknown significance was found in two patients. It was present in the general population with a frequency of 0.0038. In conclusion, no evidence of <i>KCNQ1</i> or <i>KCNE2</i> mutations being associated with growth hormone excess was found. Mutation screenings of larger patient series and additional functional experiments are needed to shed more light on the roles of <i>KCNQ1</i> related genes in growth hormone secretion.</p> <p>Ryhmämme raportoi vastikään julkaistussa tutkimuksessaan <i>KCNQ1</i>-geenin mutaatioiden aiheuttavan kasvuhormonivajetta ja äidiltä perittyä ienten liikakasvua. <i>KCNQ1</i> on kaliumkanavaproteiinia koodaava geeni, jonka mutaatioiden tiedetään ennestään liittyvän pitkä-QT-oireyhtymään. Ryhmämme alkuperäisessä tutkimuksessa <i>KCNQ1</i>:n ekspressio yhdessä <i>KCNE2</i>-alayksikön kanssa vähensi aivolisäkkeen hormonin eritystä toiminnallisissa kokeissa. Tämän työn tavoitteena oli selvittää, voivatko ituradan mutaatiot <i>KCNQ1</i>:ssä ja <i>KCNE2</i>:ssa, joka koodaa kaliumkanavan toiminnallista alayksikköä, liittyä myös vastakkaiseen ilmiöön eli kasvuhormonin liialliseen eritykseen. Kasvuhormonin liikaeritys aiheuttaa akromegaliaa, jonka taustalla on tyypillisesti kasvuhormonia erittävä aivolisäkkeen kasvain. Etsin Sanger-sekvensoinnilla ituradan mutaatioita 45 akromegaliapotilailta ja ennustin mutaatioiden vaikutukset proteiinien toimintaan <i>in silico</i> -työkaluilla. <i>KCNQ1</i>:stä löytyi vain syvällä introneissa sijaitsevia ja synonyymisiä polymorfismeja, jotka olivat todennäköisesti harvittomia ennusteiden ja varianttien yleisen populaation frekvenssien perusteella. <i>KCNE2</i>-geenistä löytyi kahdelta potilaalta merkitykseltään tunneton heterotsygootinen mutaatio c.22A>G, p.(Thr8Ala), jonka frekvenssi oli 0.0038 yleisessä populaatiossa. Kaiken kaikkiaan todisteita <i>KCNQ1</i>:n ja <i>KCNE2</i>:n mutaatioiden vaikutuksesta kasvuhormonin liialliseen eritykseen ei löytynyt. Mutaatioiden etsimistä tätä suuremmilta potilassarjoilta sekä toiminnallisia kokeita tarvitaan lisätiedon saamiseksi <i>KCNQ1</i>:n ja sen kanssa toimivien geenien merkityksestä kasvuhormonin erityksen säätelyssä.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>KCNQ1</i> , <i>KCNE2</i> , kasvuhormoni, somatotropinooma, akromegalia			
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors FT Johanna Känsäkoski, prof. Taneli Raivio			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Viikin tiedekirjasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Viikin poltetun kumigorillan muistolle

Sisällys

Lyhenteet.....	6
1 Johdanto.....	9
1.1 Kasvuhormoni.....	9
1.1.1 Vaikutus senttimetreistä sosiaaliseen asemaan.....	9
1.1.2 Eritys aivolisäkkeestä ja vaikutus IGF-1:n eritykseen.....	9
1.1.3 Katsaus erityksen hormonaaliseen säätelyyn.....	12
1.1.4 Pituuskasvun säätely yhdessä IGF-1:n kanssa.....	15
1.1.5 Fysiologiset tehtävät ja vaikutus elämänlaatuun.....	16
1.2 Somatotropinooma.....	17
1.2.1 Somatotropinoomien yhteys akromegaliaan ja gigantismiin.....	17
1.2.2 Somatotropinoomille altistavat perinnölliset geenivirheet.....	19
1.3 <i>KCNQ1</i> ja <i>KCNE2</i>	25
1.3.1 <i>KCNQ1</i> :n ja <i>KCNE2</i> :n muodostamat kaliumkanavat.....	25
1.3.2 <i>KCNQ1</i> -geenin mutaatioiden yhteys kasvuhormonivajeeseen.....	26
1.3.3 <i>KCNQ1</i> :n ja <i>KCNE2</i> :n mahdollinen osallistuminen somatotropinoomien syntyyn.....	27
1.4 Työn tarkoitus.....	28
2 Aineisto ja menetelmät.....	28
2.1 Työn kulku tiivistetysti.....	28
2.2 Potilasaineisto.....	29
2.3 PCR-olosuhteiden optimointi ja alukkeiden testaus.....	29
2.4 PCR eli polymeerasiketjureaktio.....	30
2.5 Sanger-sekvensointi.....	33
2.6 Sekvenssien tarkistus.....	33
2.7 Synonyymisten ja intronisten mutaatioiden vaikutusten ennustus.....	33
2.8 Ei-synonyymisten mutaatioiden vaikutusten ennustus.....	34
3 Tulokset.....	35
3.1 <i>KCNQ1</i> -geenin ennusteiden mukaan harmittomat variantit.....	37
3.2 <i>KCNE2</i> -geenin missense-mutaatio.....	37
4 Pohdinta.....	41
4.1 Tulosten tarkastelu.....	41
4.2 <i>KCNQ1</i>	41
4.3 <i>KCNE2</i>	43

4.4 Rajoitukset ja ongelmakohdat.....	44
4.5 Johtopäätökset.....	45
4.6 Tutkimuksen jatko.....	46
5 Liitteet.....	46
6 Kiitokset.....	46
7 Kirjallisuus.....	47

Lyhenteet

3PA	the paraganglioma, pheochromocytoma and pituitary adenoma association; samassa suvussa tai yksilössä esiintyvät paragangliooma, feokromosytooma ja aivolisäkkeen adenooma
1000G	1000 Genomes –tietokanta
AC	adenylaattisyklaasi
AIP	aryl hydrocarbon receptor interacting protein (aryylihiilivetyreseptorin kanssa vuorovaikuttavaa) –proteiinia koodaava geeni
ALS	acid labile subunit; happolabiili alayksikkö
cAMP	syklinen adenosiinimonofosfaatti
CBP	CREB-binding protein; CREB-proteiiniin sitoutuva proteiini
cDNA	complementary DNA; lähetti-RNA:sta käänteistranskriptiolla kopioitu DNA
<i>CDKN1B</i>	cyclin dependent kinase inhibitor 1B (sykliiniriippuvaista kinaasi-inhibiittori (p27(KIP1)) –proteiinia koodaava geeni
CREB	cAMP responsive element binding protein; CREB-transkriptiofaktori
$C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$	proteiinikinaasi A:n katalyyttisiä alayksiköitä
dbSNP	Database of Single Nucleotide Polymorphisms –tietokanta
ENSP	Ensembl-tietokantaan tallennetun proteiinin tunnuksen alkuosa
ESE	exonic splicing enhancer; eksonissa sijaitseva silmukoinnin tehostajakohta
ESS	exonic splicing silencer; eksonissa sijaitseva silmukoinnin hiljentäjäkohta
EVS	Exome Variant Server –tietokanta
ExAC	Exome Aggregation Consortium –tietokanta
FASTA	sekvenssien esittämiseen käytettävä FASTA-tiedostomuoto
FIMM	Institute for Molecular Medicine Finland; Suomen molekyyli lääketieteen instituutti
FIPA	familial isolated pituitary adenoma; suvuittain ilman oireyhtymän kaltaisia piirteitä esiintyvät aivolisäkkeen adenoomat
G1-vaihe	solusyklin vaihe, jossa solut kasvavat kokoa ja valmistautuvat jakaantumiseen
GDP	guanosiinidifosfaatti
<i>GH1</i>	growth hormone 1 -proteiinia (kasvuhormonia) koodaava geeni
GH3	rotan aivolisäkkeen kasvaimesta eristetty kasvuhormonia ja prolaktiinia erittävä solulinja
GHBP	growth hormone-binding protein; kasvuhormonin sitojaproteiini
GHR	growth hormone receptor; kasvuhormonireseptori
GHRH	growth hormone-releasing hormone; kasvuhormonin vapauttajahormoni
GHRHR	growth hormone-releasing hormone receptor; kasvuhormonin vapauttajahormonin reseptori
<i>GNAS</i>	GNAS complex locus -proteiinia koodaava geeni
gnomAD	The Genome Aggregation Database –tietokanta
<i>GPR101</i>	G protein-coupled receptor 101 -proteiinia koodaava geeni
$G\alpha$	G-proteiinin α -alayksikkö
GTP	guanosiinitrifosfaatti
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee -geenien nimihakemisto
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor 1 α –transkriptiofaktori
HSF	Human Splicing Finder –työkalu mutaation vaikutuksen ennustamiseen
IGF-1	insulin-like growth factor 1; insuliininkaltainen kasvutekijä 1
IGF-2	insulin-like growth factor 2; insuliininkaltainen kasvutekijä 2
IGFBP	insulin-like growth factor-binding protein; insuliininkaltaisen kasvutekijän sitojaproteiini

IRS	insulin receptor substrate; insuliinireseptorisubstraatteihin viittaava lyhenne
JAK2	janus kinase 2; januskinaasi 2
KCNE	potassium voltage-gated channel subfamily E –proteiiniperhe
KCNE2	potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 2 –proteiinia koodaava geeni
KCNQ1	potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1 -proteiinia koodaava geeni
kDa	kilodalton
Kv	jänniteherkkiin kaliumkanaviin viittaava lyhenne
MAF	minor allele frequency; yleisintä harvinaisemman alleelin frekvenssi
MEN1	menin 1 (meniini 1) –proteiinia koodaava geeni
MEN1	MEN1-oireyhtymä; 1-tyypin multipple endokriininen neoplasia
MEN4	MEN4-oireyhtymä; 4-tyypin multipple endokriininen neoplasia
NCBI	The National Center for Biotechnology Information; Yhdysvaltain terveysviraston hallinnoima, usean bioinformaattisen tietokannan kokonaisuus
NF1	neurofibromin 1 (neurofibromiini 1) –proteiinia koodaava geeni
NGS	next generation sequencing; uuden sukupolven sekvensointi
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man –hakemisto
ORF	open reading frame; DNA-juosteen avoin lukukehys
PAP	pituitary adenoma predisposition; AIP:n geenivirheistä johtuva perinnöllinen taipumus kehittää aivolisäkkeen adenooma
PCR	polymerase chain reaction; polymeraasiketjureaktio
PKA	proteiinikinaasi A
PKC	proteiinikinaasi C
Polyphen-2	Polymorphism Phenotyping v2 -in silico-työkalu
POU1F1(PIT1)	POU class 1 homeobox 1 -proteiinia koodaava geeni
PPNAD	primary pigmented nodular adrenocortical disease; sairaus, jossa lisämunuaisten kuoret turpoavat ja kehittävät tummia rakkuloita
PRKARIA	protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha –proteiinia koodaava geeni
PTTG1	pituitary tumor-transforming 1 -proteiinia koodaava geeni
QT-aika	sydänsähkökäyrässä aika, joka kuuluu kammiodien supistumisesta niiden lepovaiheeseen
RI α , RII α	proteiinikinaasi A:n toimintaa estäviä alayksiköitä
RI β , RII β	proteiinikinaasi A:n toimintaa estäviä alayksiköitä
RefSeq	The Reference Sequence -tietokanta; osa NCBI:ta
rs-koodi	dbSNP-tietokannasta löytyvän yhden nukleotidin polymorfismin rs-alkuinen tunnus
S1-S6	KCNQ1:n rakenneyksiköitä
S-vaihe	solusyklin vaihe, jossa DNA kopioituu
SDHA	succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A –proteiinia koodaava geeni
SDHB	succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B –proteiinia koodaava geeni
SDHC	succinate dehydrogenase complex subunit C –proteiinia koodaava geeni
SDHD	succinate dehydrogenase complex subunit D –proteiinia koodaava geeni
Ser	seriini
SH2B1	SH2B adaptor protein 1 –proteiinia koodaava geeni
SHC1	SHC adaptor protein 1 –proteiini

SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant -in silico-työkalu
<i>SIRPα</i>	signal regulatory protein alpha –proteiinia koodaava geeni
SST	somatostatiini
STAT	signal transducer and activator of transcription –proteiini
UniProt	The Universal Protein Resource –tietokanta
UniProtKB	The Universal Protein Resource Knowledgebase; Uniprot-tietokannan osa
Wnt	Wnt-signaalintiproteiinien perheeseen viittaava lyhenne
X-LAG	X-linked acrogigantism; X-kromosomiin kytkeytynyt akrogigantismi

1 Johdanto

1.1 Kasvuhormoni

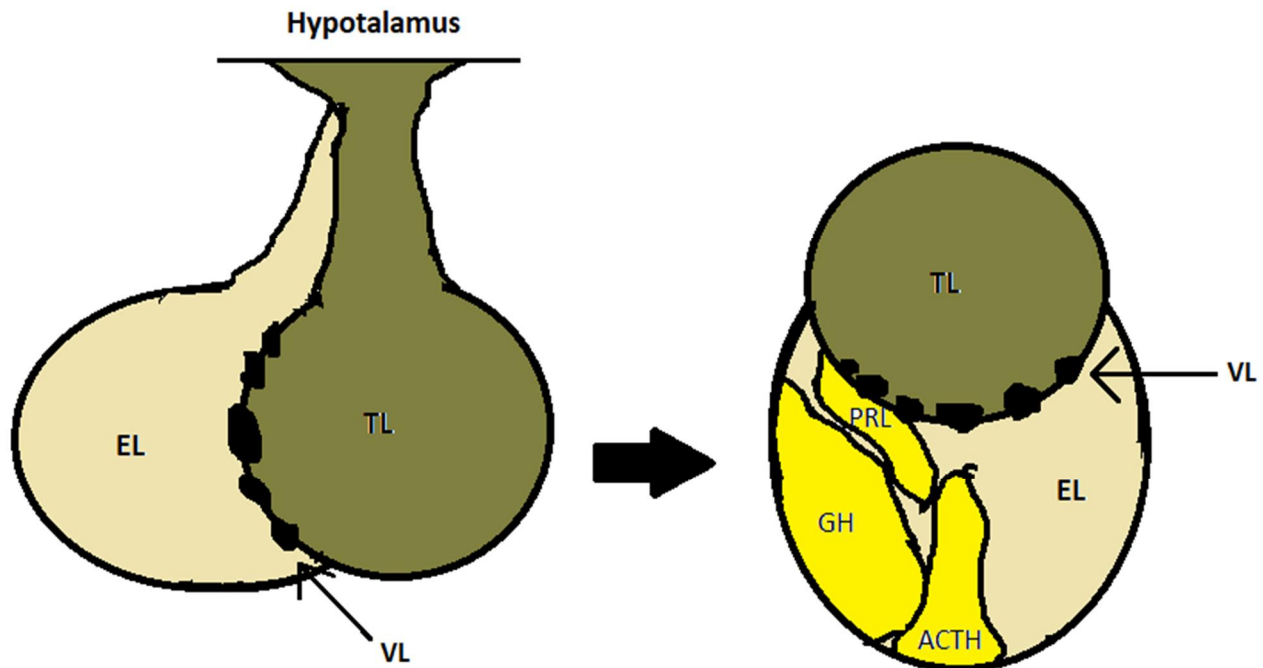
1.1.1 Vaikutus senttimetreistä sosiaaliseen asemaan

Kasvuhormoni (GH, growth hormone) on merkittävä pituuden, kehonkoostumuksen ja kasvopiirteiden muovaaja. Pituus voi kertoa ihmisestä paljon muutakin kuin senttimetreissä ilmoitetun mitan: Sen on havaittu olevan suoraan verrannollinen joidenkin syöpien sekä kääntäen verrannollinen sydän- ja verisuonitautien sekä itsemurhan riskeihin (Batty ym., 2009). Pitkät ihmiset ovat keskimäärin paremmassa sosioekonomisessa asemassa kuin lyhyet, ja pituus sekä viehättävät piirteet ovat olennainen osa parinvalintaa. Esimerkiksi Euroopassa ja Pohjois-Amerikassa 1950-90-luvuilla oli tavallista, että tyttöjä, joiden pelättiin kasvavan liian pitkiksi (kasvuennusteen mukaan yli 175-senttisiksi), hoidettiin estrogeenilla kasvun hillitsemiseksi (Lee & Howell, 2006). Hoitoa perusteltiin pituudesta tytöille aiheutuvilla erilaisilla sosiaalisilla ongelmilla, erityisesti vaikeudella löytää aviomies, sillä naisen viehättävyyden kannalta hänen oli tärkeää olla miestä lyhyempi (Lee & Howell, 2006). Vastaavasti osin samoista syistä poikien kohdalla oltiin ja ollaan enemmän huolissaan lyhyeksi jäämisestä, mitä ongelmaa hoidetaan nykyisin kasvuhormonilla (Lee & Howell, 2006). Edelleen länsimaissa miehet suosivat itseään lyhyempiä, joko keskimääräisen pituisia tai hieman lyhyempiä naisia, ja vastaavasti naiset suosivat kumppaneina pitkiä miehiä (Pisanski & Feinberg, 2013). Riippumatta sukupuolesta, kulttuurista ja seksuaalisesta suuntautumisesta, viehättävä ulkonäkö sijoittuu kymmenen tärkeimmän parinvalintaan vaikuttavan tekijän joukkoon (Lippa, 2007).

1.1.2 Eritys aivolisäkkeestä ja vaikutus IGF-1:n eritykseen

Aivolisäke on pavunmuotoinen, vajaan gramman painoinen elin, joka sijaitsee aivojen pohjassa hypotalamuksen alla turkinsatulaksi kutsutun luisen rakenteen sisällä. Aivolisäkkeen takalohko eli neurohypofyysi koostuu pääosin hermokudoksesta ja muodostaa aivolisäkkeen varren kautta suoran yhteyden hypotalamukseen; lisäksi se erittää oksitosiinia ja vasopressiiniä (Asa & Ezzat, 2009). Etulohko eli adenohypofyysi puolestaan on epiteelikudosta, jossa sijaitsevat suurin osa eri aivolisäkehormoneja (kasvuhormonia, gonadotropiineja, prolaktiinia, kortikotropiinia, lipotropiinia ja tyreotropiinia) erittävistä soluista. Kasvuhormonia erittävät solut eli somatotroopit sijaitsevat aivolisäkkeen etulohkon sivuosissa, ja kaikista etulohkon soluista niitä on noin puolet. Etu- ja

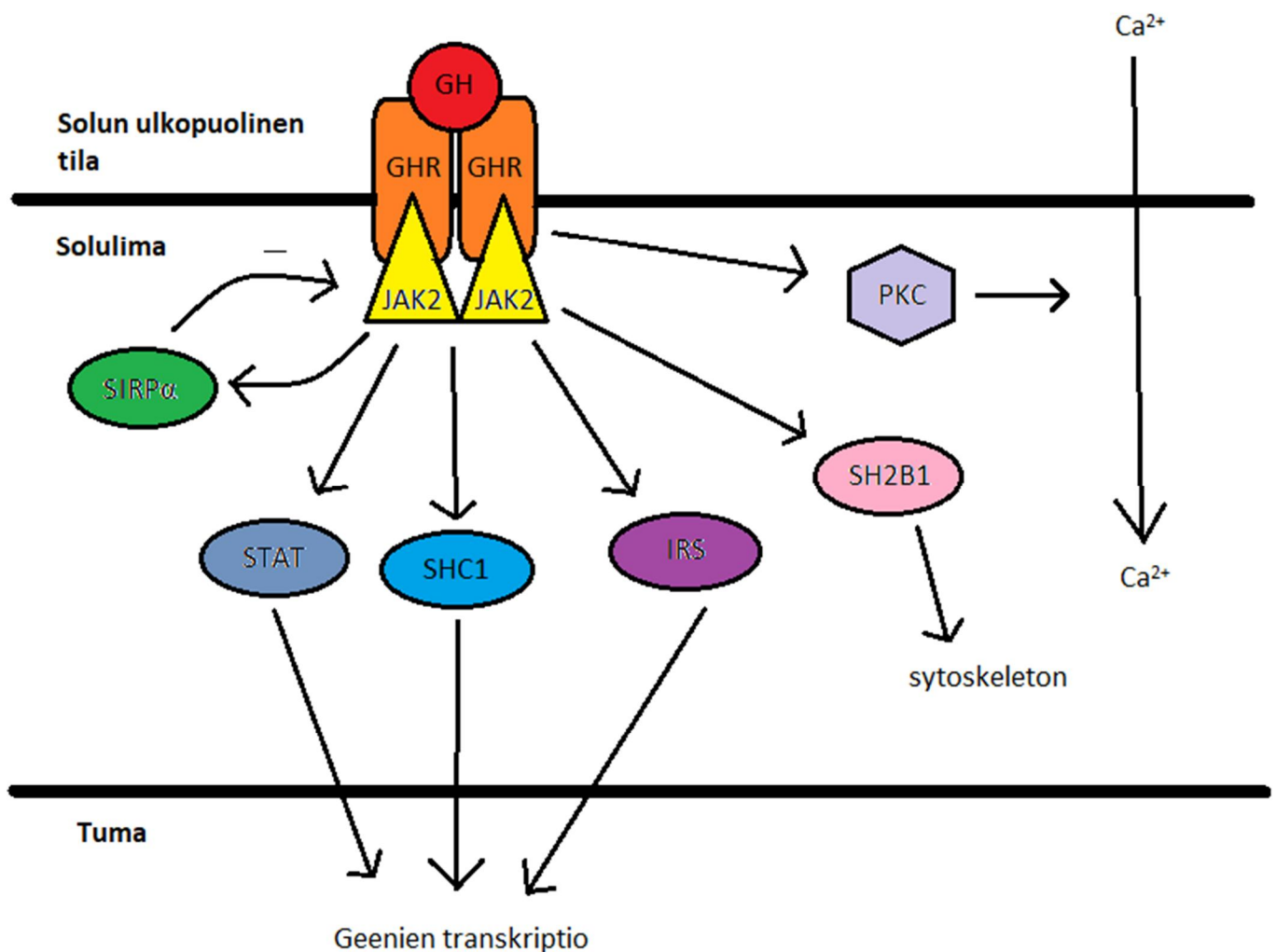
takalohkon välissä on Rathken pussin jäämistä muodostunut, surkastunut välilohko (kuva 1) (Asa & Ezzat, 2009).



Kuva 1. Aivolisäke ja somatotrooppisolut. Aivolisäke koostuu etu- ja takalohkosta, ja elin on yhteydessä takalohkon varren kautta hypotalamukseen (vasemmalla). Kasvuhormonia tuottavat somatotrooppisolut sijaitsevat aivolisäkkeen etulohkon sivuosissa, mikä näkyy horisontaalisessa poikkileikkauksessa (oikealla). EL: etulohko; TL: takalohko; VL: välilohko; GH: kasvuhormonia erittäviä soluja; PRL: prolaktiinia erittäviä soluja; ACTH: kortikotropiinia erittäviä soluja. Kuva on muokattu alkuperäisestä kuvasta (Figure 1, Asa & Ezzat, 2009).

Somatotroopit tuottavat kooltaan ja aktiivisuudeltaan erilaisia kasvuhormonin isomuotoja, joista parhaiten tunnettu ja aivolisäkkeestä runsaimmin erittyvä muoto on kooltaan 22 kilodaltonia (kDa) (Murray & Clayton, 2013). Eritys tapahtuu sykäyksittäin koko elämän ajan, ja naisilla sykäykset ovat epäsäännöllisempiä ja kokonaiseritys runsaampaa kuin miehillä (Pincus ym., 1996). Kasvuhormonin erityspulssit ovat voimakkaimpia öisin ja tiheimpiä murrosiässä, jonka jälkeen eritystiheys vähenee iän myötä (Murray & Clayton, 2013). Aivolisäkkeen ohella hormonia erittyy myös jonkin verran muualta elimistöstä, kuten istukasta, hypotalamuksesta, lymfosyyteistä, neutrofiileistä, kateenkorvasta ja maitorauhasesta (Le Roith ym., 2001). Kasvuhormoni kulkee verenkierrossa joko kasvuhormoniin sitoutuvaan proteiiniin (GHBP, growth hormone binding protein) kiinnittyneenä tai vapaana ja se sitoutuu kohdesolujensa solukalvoilla sijaitseviin kasvuhormonireseptoreihin (Murray & Clayton, 2013; Le Roith ym., 2001). Yksinkertaistettuna hormonin sitoutuminen reseptoreihin saa aikaan reseptorien dimerisaation ja lukuisten fosforylaatiotapahtumien kautta januskinaasi 2 (JAK2) – tai proteiinkinaasi C (PKC) –välitteisten signaalintireittien käynnistymisen, jotka johtavat lopulta

kasvuhormonin vaikutuksesta aktivoituvien geenien transkriptioon, solun tukirangan ja liikkuvuuden muutoksiin, JAK2-signaaloinnin vähenemiseen tai kalsiumkanavien aktivoitumiseen (Murray & Clayton, 2013). JAK2 aktivoi edelleen STAT (signal transducer and activator of transcription) –, SHC1 (SHC adaptor protein 1) –, SH2B1 (SH2B adaptor protein 1) –, SIRP α (signal regulatory protein α) – ja insuliinireseptorisubstraatti (IRS) –signaalintireittejä, mutta PKC:n aktivoituminen on JAK2:sta riippumatonta (kuva 2). SH2B1 säätelee solujen sytoskeletonia ja liikkuvuutta, ja SIRP α puolestaan on JAK2-signaaloinnin takaisinsäätelijä (Carter-Su ym., 2016).



Kuva 2. Kasvuhormonin aktivoimat signalointireitit. Kasvuhormonin sitoutuessa reseptoreihinsa reseptorit dimerisoituvat, mikä käynnistää JAK2- tai PKC-välitteisen signaloinnin. JAK2-välitteinen signalointi johtaa edelleen kasvuhormonin vaikutuksesta aktivoituvien geenien transkriptioon STAT-, SHC1- tai IRS-proteiinien välityksellä. PKC aktivoituu kasvuhormonin vaikutuksesta ilman JAK2:n osallisuutta, ja se saa soluissa aikaan muun muassa kalsiumkanavien aukeamisen. GH: kasvuhormoni; GHR: kasvuhormonireseptori; JAK2: januskinaasi 2; STAT: signal transducer and activator of transcription –proteiini; SHC1: SHC adaptor protein 1 –proteiini; IRS: insuliinireseptorisubstraatti. Kuva on muokattu alkuperäisistä kuvasta, eikä siinä ole selkeyden vuoksi esitetty proteiinien fosforylaatioita (Figure 4, Murray & Clayton, 2013; Figure 1, Carter-Su ym., 2016).

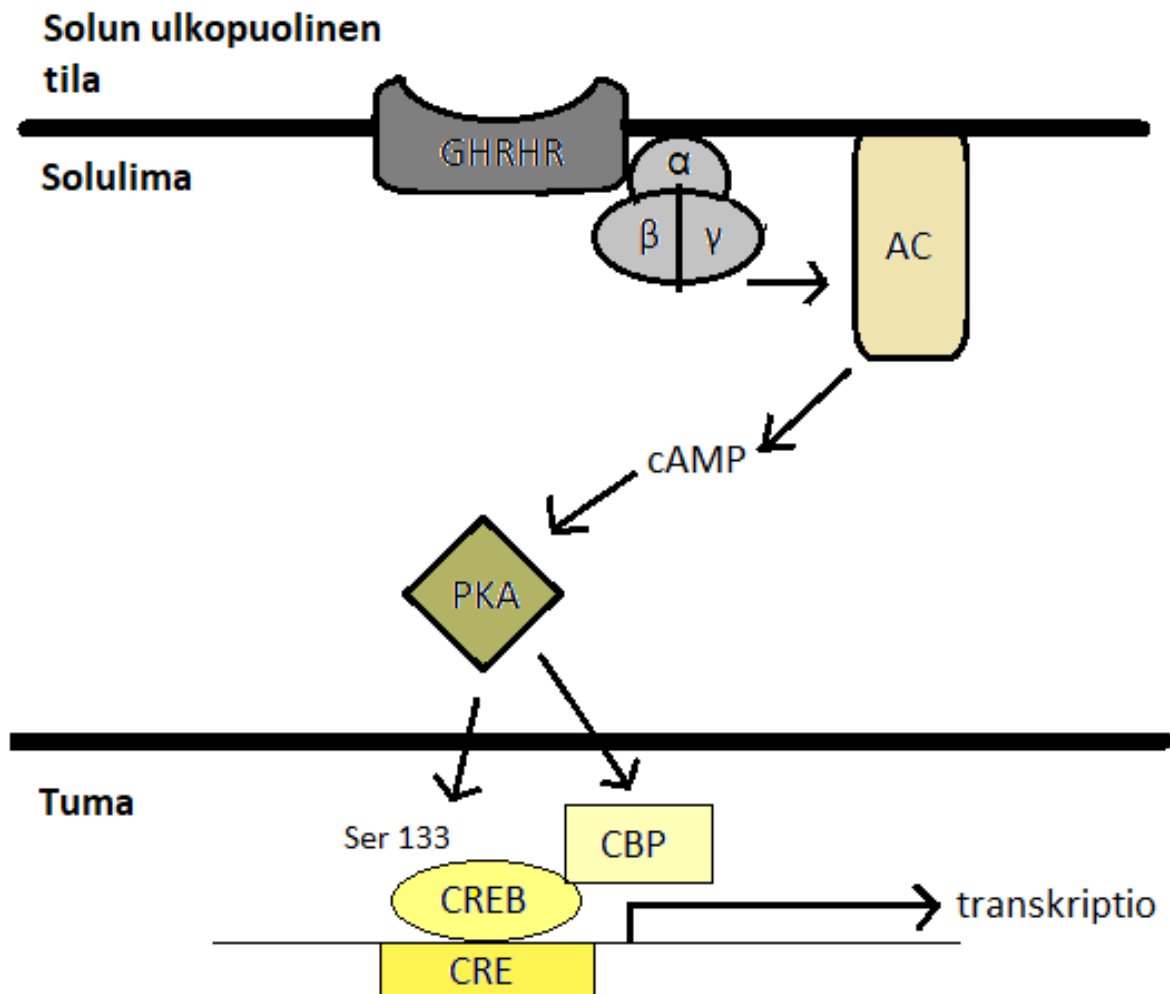
Kasvuhormonin vaikutusten tärkein välittäjä elimistössä on insuliinin kaltainen kasvutekijä 1 (IGF-1), jota erittyy kasvuhormonin vaikutuksesta JAK2-signaaloinnin kautta maksasta ja muista kudoksista. IGF-1 kulkee kohdesoluihinsa verenkierron välityksellä, mutta se vaikuttaa kudoksissa myös paikallisena kasvutekijänä, eikä sen erityys paikallisesti ole pelkästään kasvuhormonin säätelemää (Lupu ym., 2001; Le Roith ym., 2001). Vereen siirtyvä IGF-1 on pääosin peräisin maksasta (Yakar ym., 2002). IGF-1 kulkee verenkierrossa insuliinin kaltaisen kasvutekijän kuljettajaproteiineihin (IGFBP, insulin-like growth factor binding protein) ja happolabiiliin alayksikköön (ALS; acid labile subunit) sitoutuneena, ja kuten kasvuhormonikin, se sitoutuu kohdesolujensa solukalvolla sijaitseviin erityisiin reseptoreihin (Le Roith ym., 2001; Murray & Clayton, 2013).

1.1.3 Katsaus erityksen hormonaaliseen säätelyyn

Hypotalamuksesta erittyvä kasvuhormonin vapauttajahormoni (growth hormone releasing hormone, GHRH) kiihdyttää nimensä mukaisesti kasvuhormonia koodaavan *GHI*-geenin (OMIM 139250) transkriptiota sekä hormonin eritystä aivolisäkkeen somatotrooppisoluista. Lisäksi eläinkokeet ovat osoittaneet sen säätelevän somatotrooppien kasvua ja jakautumista (Le Tissier ym., 2005). GHRH sitoutuu G-proteiinivälitteisiin reseptoreihin somatotrooppien solukalvoilla, mikä aktivoi reseptoreihin liittyneet G-proteiinikompleksit. G-proteiiniperheen jäsenet muodostavat keskenään heterotrimeereitä eli kolmesta toiminnallisesta yksiköstä muodostuvia komplekseja. Nämä kompleksit rakentuvat useista mahdollisista eri α -alayksiköiden ($G\alpha$) sekä $\beta\gamma$ -dimeerien yhdistelmistä (Ringel ym., 1996). G-proteiinit välittävät solunulkoisia viestejä solujen sisään sitomalla ja hydrolysoimalla guanosiinitrifosfaattia (GTP:tä) α -alayksikön, joka on GTP:aasi, avulla. Inaktiivisessa tilassa guanosiinidifosfaatti (GDP) on sitoutunut α -alayksikköön, ja proteiinikompleksin aktivoituessa GHRH:n sitoutuessa reseptoriin GDP vaihtuu GTP:ksi ja se irtaoo yhdessä α -yksikön kanssa $\beta\gamma$ -dimeeristä, jolloin erillään olevat heterotrimeerin osat vapautuvat säätelemään viestiketjun seuraavien molekyylien aktiivisuutta (Ringel ym., 1996).

GHRH:n vaikutuksesta $G\alpha$ -alayksiköt aktivoivat adenyylaattisyklaasia, joka lisää syklisen adenosinimonofosfaatin (cAMP:n) tuotantoa. Lisääntynyt cAMP:n määrä solussa aktivoi edelleen proteiinikinaasi A:ta (Ringel ym., 1996). Proteiinikinaasi A fosforyloi seriini 133 –aminohapon kohdalta CREB (cAMP response element-binding protein) -transkriptiofaktoria, joka sitten sitoutuu

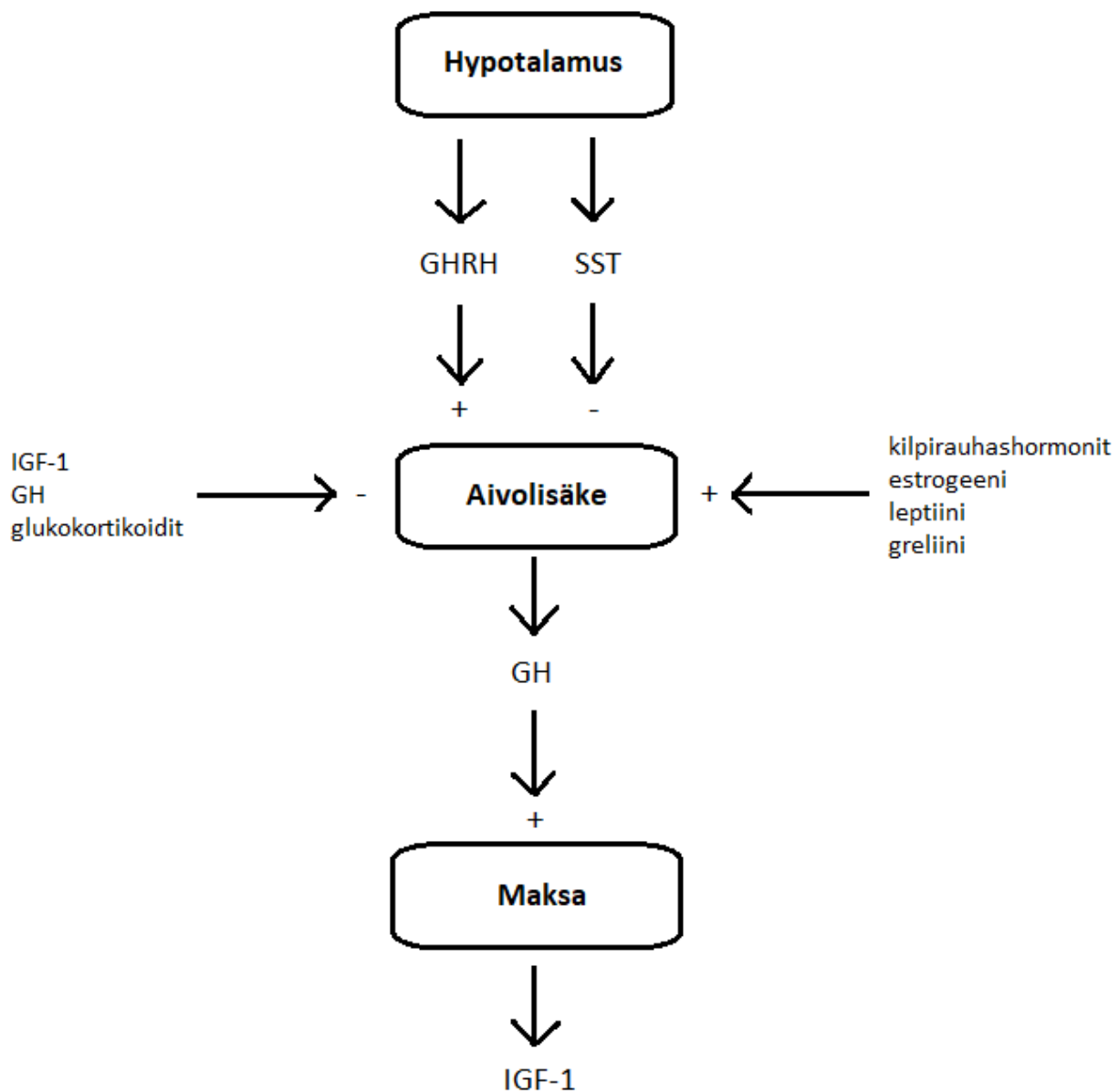
fosforyloituna useiden geenien promoottoreissa sijaitseviin CRE (cAMP response element) -alueisiin aivolisäkkeessä aktivoiden kasvuhormonin transkriptiota ja somatotrooppien jakautumista. Fosforyloituu CREB-transkriptiofaktoriin sitoutuu vielä CBP-proteiini (CREB-binding protein), jota PKA fosforyloi niin ikään ja joka tarvitaan transkription varsinaiseen alkamiseen (kuva 3) (Rosenberg ym., 2006).



Kuva 3. Kasvuhormonin erityksen käynnistyminen. GHRH:n sitoutuessa reseptoriinsa G-proteiinikompleksi aktivoituu, minkä seurauksena α -alaysikkö aktivoi adenylaattisyklaasia. Adenylaattisyklaasi kiihdyttää cAMP:n, jonka kohonnut pitoisuus aktivoi proteiinikinaasi A:ta, tuotantoa. PKA fosforyloi CREB-proteiinia seriini 133 –aminohapon kohdalta sekä CBP:tä. Sitten CREB sitoutuu promoottorien CRE-alueisiin aktivoiden transkriptiota yhdessä CBP:n kanssa. G-proteiinin GTPaasiaktiivisuutta ei ole esitetty. GHRHR: kasvuhormonin vapauttajahormonin reseptori; α , β , γ : α -alaysikön ja $\beta\gamma$ -dimeerin muodostama G-proteiinikompleksi; AC: adenylaattisyklaasi; cAMP: syklinen adenosinimonofosfaatti; PKA: proteiinikinaasi A; Ser 133: seriini 133; CREB: CREB-transkriptiofaktori; CRE: CRE-alue; CBP: CBP-proteiini. Kuva on muokattu alkuperäisestä kuvasta (Figure 1, Rosenberg ym., 2006).

Somatostatiini puolestaan toimii GHRH:n vastavaikuttajana estäen kasvuhormonin eritystä. Se, kuten GHRH:kin, erittyy hypotalamuksesta ja sitoutuu somatotrooppisolujen pinnalla G-proteiinivälitteisiin reseptoreihin, jotka liittyvät adenylaattisyklaasiin (Theodoropoulou & Stalla, 2013). Somatostatiini hillitsee kasvuhormonin eritystä estämällä adenylaattisyklaasin aktivoitumista ja cAMP:n tuotantoa sekä lisäämällä somatotrooppien hyperpolarisaatioita kaliumkanavien välityksellä (Theodoropoulou & Stalla, 2013). Somatostatiinin hormonieritystä ehkäisevä vaikutus perustuu eksosytoosin ja mahdollisesti myös kasvuhormonin transkription sekä somatotrooppien solunjakautumisen estämiseen.

Somatostatiini vähentää myös IGF-1:n tuotantoa kasvuhormonin tuotannon estämisen myötä (Theodoropoulou & Stalla, 2013). IGF-1 puolestaan itsessään hillitsee kasvuhormonin eritystä estämällä sitä koodaavan *GHI*-geenin ilmenemistä ja lisäämällä somatostatiinin tuotantoa hypotalamuksesta (Puche & Castilla-Cortázar, 2012). Hypotalaamisten hormonien lisäksi lukuisat muut hormonit säätelevät kasvuhormonin eritystä: estrogeeni, kilpirauhashormonit sekä vatsasta erittyvät leptiini ja greliini kiihdyttävät hormonisynteesiä, kun taas lisämunuaiskuoren glukokortikoidit ja kasvuhormoni itse hillitsevät omaa tuotantoaan (kuva 4) (Jee & Baron, 2016; Murray & Clayton 2013; Le Roith ym., 2001).



Kuva 4. Tärkeimmät kasvuhormonin eritystä säätelevät hormonit. Hypotalamuksesta erittyvä GHRH sekä kilpirauhashormonit, estrogeeni, leptiini ja greliini lisäävät kasvuhormonin eritystä aivolisäkkeestä. Kasvuhormoni aktivoi IGF-1:n tuotantoa maksasta ja muista kudoksista. Hypotalaaminen somatostatiini, lisämunuaiskuoren glukokortikoidit sekä kasvuhormonin ja IGF-1:n kohonneet pitoisuudet puolestaan hillitsevät kasvuhormonin tuotantoa. GHRH: kasvuhormonin vapauttajahormoni; SST: somatostatiini; GH: kasvuhormoni; IGF-1: insuliinin kaltainen kasvutekijä 1.

1.1.4 Pituuskasvun säätely yhdessä IGF-1:n kanssa

Ihmisen pituuskasvun aiheuttaa luiden pituuskasvu rustoisissa kasvulevyissä metafyysiksi kutsutulla alueella luunpään (epifyysin) ja luuvarren (diafyysin) välissä. Pituuskasvua ohjaavat pohjimmiltaan joko suoraan tai välillisesti kasvulevyjen ruston kasvua eli kondrogeneesiä säätelevät tekijät, joihin lukeutuvat hormonit, kasvulevyjen ympärillä olevien soluväliaineen ja kudoksen koostumukset, kudoshormonit, tulehdussytokiinit, ravitsemus sekä solun sisällä lukuisat viestimekanismit ja transkription säätelyyn, DNA:n korjaamiseen ja kromatiinin muokkaamiseen osallistuvat proteiinit

(Jee & Baron, 2016). Koko genomien laajuisissa assosiaatiotutkimuksissa aikuispituuteen on havaittu liittyvän jopa yli 400 lokusta (Wood ym., 2014).

Kasvulevyissä on kolme vyöhykettä: lepovyöhyke, jossa todennäköisesti sijaitsevat tulevan luun rustoiset, kantasolumaiset esisolut, ja joka varastoi glykogeneeniä, lipidejä ja muita kasvulevyn solujen tarvitsemia makromolekyylejä; pylväittäin järjestäytynyt jakautumisvyöhyke, jossa solujen lukumäärä kasvaa sekä kasvuvyöhyke, jossa jakaantuneet solut kasvavat kokoa (Jee & Baron, 2016). Solujen jakaantuessa ja turvotessa lepovyöhyke surkastuu ja samalla erittyy myös soluväliainetta. Lopuksi kondrogeneesin tuloksena muodostunut tuore rusto korvautuu luulla kasvulevyn ja sitä rajaavan luun eli metafyysin rajalla, kun verisuonet, osteoblastit ja osteoklastit tunkeutuvat solujen väleihin ja rustoiset kondrosyytit kuolevat (Jee & Baron, 2016; Abad ym., 2002; Lupu ym., 2001). Kasvulevyjen vanhenemisen nopeudessa on yksilöllisiä eroja, jotka voivat myös liittyä lapsen yleiseen kypsyymistähtiin: luonnostaan lyhyillä ihmisillä kondrogeneesi on hidasta ja pitkillä taas vilkasta (Jee & Baron, 2016).

Kasvuhormoni-IGF-1-akseli on erittäin tärkeä, hiirikokeiden perusteella jopa tärkein, kasvua säätelevä mekanismi lukuisine akselin toimintaa ohjaavine geeneineen (Lupu ym., 2001). Kasvuhormonilla ja IGF-1:llä on kondrogeneesissä itsenäisiä ja osin päällekkäisiä tehtäviä: molempien tiedetään kiihdyttävän kondrosyyttien jakautumista jakautumisvyöhykkeellä (Lupu ym., 2001). Lisäksi on todisteita siitä, että IGF-1 yhdessä kasvuhormonin tuotannosta riippumattoman insuliinin kaltaisen kasvutekijä 2:n (IGF-2:n) kanssa edistäisivät kondrosyyttien koon kasvua (Le Roith ym., 2001; Uchimura ym., 2017). Lisäksi kasvuhormoni ja IGF-1 ovat välttämättömiä luumassan kehittämisessä lapsuudessa ja nuoruudessa sekä luumassan ylläpidossa ja uusiutumisessa aikuisena (Giustina ym., 2008; Lupu ym., 2001).

1.1.5 Fysiologiset tehtävät ja vaikutus elämänlaatuun

Kasvuhormonilla on elimistössä laaja-alaisia vaikutuksia pituuskasvun kiihdyttämisen ohella: se muun muassa tehostaa lihaskasvua ja immuunipuolustusta, edesauttaa rasvakudoksen muuntamista energiaksi sekä estää insuliinin toimintaa (Le Roith ym., 2001). Kasvuhormonin puute aiheuttaa lapsilla merkittävää kasvun jälkeenyäämistä ja aikuisilla lihasmassan ja fyysisen suorituskyvyn heikkenemistä, luuntiheyden alentumista, rasvamassan suhteellisen osuuden kasvua, sydän- ja verisuonisairauksia, insuliiniresistenssiä sekä apeutta ja väsymystä (Ayuk & Sheppard, 2006). IGF-1 puolestaan osallistuu luiden, keskushermoston, munuaisten, lihasten, kateenkorvan ja sydän- ja

verenkiertoelimistön kasvuun ja niiden toimintojen ylläpitoon. Sillä on myös tärkeä rooli sikiön kehityksessä, sukusolujen kypsyemisessä sekä lisämunuaisen- ja sukupuolihormonien valmistamisessa. Solutasolla IGF-1 on solusyklin säätelijä, joka osallistuu apoptoosin estämiseen, solujen jakaantumiseen ja proteiinisynteesiin (Le Roith ym., 2001). Vastaavasti IGF-1:n puute voi aiheuttaa lapsilla Laronin oireyhtymää, jossa tyypillisiä ovat muun muassa kasvun huomattava hidastuminen, aivojen ja sydämen pienikokoisuus, lihasten kehityksen viivästyminen ja huonokuntoiset iho, kynnet ja hiukset (Puche & Castilla-Cortázar, 2012). Aikuisilla IGF-1-vaje taas altistaa maksakirroosille ja erilaisille ikääntymiseen liittyville sairauksille, kuten sydän- ja verisuonitaudeille, metaboliselle oireyhtymälle, hermostorappeumasairauksille ja luurankolihashen sekä luuston heikkenemiselle.

Liiallinen kasvuhormonin ja sen myötä IGF-1:n erityis taas aiheuttavat akromegaliaa ja gigantismia, jotka voivat niin ikään heikentää niistä kärsivien elämänlaatua ja lisätä merkittävästi kuolleisuutta (Colao ym., 2004). Akromegaliassa sairastuneilla on tyypillisesti suurentuneet kehon ääriosat, kuten sormet, varpaat, nenä, kulmakaaret, korvat ja leuka. Lisäksi he kärsivät usein iho- ja pehmytkudosongelmista, kuten pehmytkudoksen liikakasvusta, ihon rasvoittumisesta, varsiluomista ja liiallisesta hikoilusta; hengitysteiden komplikaatioista, kuten uniapneasta tai kuorsauksesta; lihas- ja nivelongelmista, päänsärystä ja näköhäiriöistä sekä epäsäännöllisistä kuukautisista tai impotenssista (Lavrentaki ym., 2017). Heille saattaa myös kehittyä vakavia sydän- ja verisuonisairauksia, insuliiniaineenvaihdunnan ongelmia (pahimmillaan diabetes), kilpirauhassairauksia tai pahanlaatuisia kasvaimia (Colao ym. 2004). Gigantismilla puolestaan tarkoitetaan kasvuhormonin liiallisesta tuotannosta aiheutuvaa liikakasvua ennen pituuskasvun loppumista. Epätavallisen nopea kasvu, joka tavallisesti huomataan murrosiän alkamiseen mennessä, on yleensä ensimmäinen oire. Lisäksi sairaus voi aiheuttaa korkeaa verenpainetta, glukoosiaineenvaihdunnan häiriöitä ja sydänsairauksia sekä varsinkin nuorilla aikuisilla aikuisten akromegalian piirteitä (Rostomyan ym., 2015).

1.2 Somatotropinooma

1.2.1 Somatotropinoomien yhteys akromegaliaan ja gigantismiin

Valtaosa aivolisäkkeessä esiintyvistä kasvaimista on adenoomia eli hyvänlaatuisia rauhas kudoksen kasvaimia. Aivolisäkkeen adenoomat ovat kohtalaisen yleisiä: niiden esiintyvyys yleisessä

populaatiossa on arviolta 17% (Ezzat ym., 2004). Ne ovat tavallisesti monoklonaalisia eli yhdestä solusta alkunsa saavia ja hitaasti kasvavia. Hyvänlaatuisuudestaan huolimatta adenoomat voivat aiheuttaa aivolisäkkeen hormonien liika- tai vajaatuotantoa tai painaa ympäröiviä rakenteita ja levitä niihin (Marques & Korbonits, 2017).

Adenoomat luokitellaan karkeasti kasvaimen koon ja hormonierityksen mukaan: Ne voivat erittää yhtä tai useampaa aivolisäkkeen tuottamaa hormonia tai ei mitään niistä (Arafah & Nasrallah, 2001). Kokonsa perusteella adenoomat voivat olla makro- tai mikroadenoomia (vastaavasti halkaisijaltaan yli tai alle 10 mm) (DeLellis, ym. 2004). Lisäksi luokittelussa voidaan hyödyntää histologisia sekä immunosytokemiaan, ultrarakenteeseen (elektronimikroskoopin tarkkuudella nähtäviin rakenneosiin) tai kirurgisiin löydöksiin perustuvia eroja (Kovacs ym., 1996).

Kasvaimen kehittyminen on monivaiheinen prosessi, joka saa tavallisesti alkunsa proto-onkogeenien aktivoitumiseen, jolloin ne muuttuvat onkogeeneiksi, tai kasvunrajoitegeenien inaktivoitumiseen, johtavista mutaatioista tai epigeneettisistä muutoksista. Myös geenien kopioklukujen muutokset, kuten monistumiset ja deleetiot, ovat mahdollisia. Muutosten seurauksena solunjakautumisen, solukuoleman, hormonivasteiden, solunsisäisen viestinnän tai solujen mikroympäristön säätely muuttuu (Marques & Korbonits, 2017; Arafah & Nasrallah, 2001). Epigeneettisten muutosten tiedetään tapahtuvan ainakin metylaation ja histonien muutosten tai miRNA:iden välityksellä (Marques & Korbonits, 2017).

Onkogeenien aktivoituminen tapahtuu yleensä dominantisti, eli jo yksi mutaatio niissä riittää käynnistämään epänormaalin solunjakautumisen; aivolisäkkeen adenoomissa usein mutatoituneita onkogeenejä ovat esimerkiksi *GNAS* erityisesti somatotropinoomissa ja *PTTG1* (Marques & Korbonits, 2017; Arafah & Nasrallah, 2001). Onkogeenien aktivoituminen saattaa myös johtaa solujen vanhenemiseen eli solunjakautumisen lopulliseen pysähtymiseen, mikä estäisi syöville ominaisten muutosten syntymisen ja selittäisi aivolisäkkeen adenoomien hyvänlaatuisuuden (Marques & Korbonits, 2017). Kasvunrajoitegeenien inaktivoituminen puolestaan tapahtuu yleensä resessiivisesti, eli molemmissa alleeleissa on tapahduttava mutaatio. Perinnöllisissä kasvaimen muodostumiselle altistavissa kasvunrajoitegeenien virheissä toisessa alleelissa on peritty mutaatio ja toisen mutaation on synnyttävä spontaanisti ennen kuin kasvain alkaa kehittyä (Arafah & Nasrallah, 2001). Spontaani mutaatio syntyy usein heterotsygotian menetyksen kautta, jolloin normaali alleeli katoaa, siihen syntyy mutaatio tai se korvautuu mutaatiota jo kantavalla alleelilla. Aivolisäkkeen

adenoomissa mutaatioita tapahtuu usein esimerkiksi kasvunrajoittajina toimivissa sykliiniriippuvaisissa kinaasi-inhibiittoreissa (Marques & Korbonits, 2017).

Somatotropinoomat ovat kasvuhormonia erittäviä aivolisäkkeen adenoomia ja niitä on erään arvion mukaan noin 20 % kaikista aivolisäkkeen kasvaimista (Arafah & Nasrallah, 2001). Akromegaliassa ja gigantismissa valtaosalla potilaista on somatotropinooma, mutta kasvuhormonin liiallista eritystä voivat aiheuttaa myös aivolisäkkeen liikakasvu tai ektooppinen kasvuhormonin tai kasvuhormonia vapauttavan hormonin (GHRH) erityys (Hannah-Shmouni ym., 2016). Akromegaliaa ja gigantismia voidaan hoitaa leikkaamalla somatotropinooma, sädehoidolla tai lääkitsemällä somatostatiinin analogeilla tai kasvuhormonireseptorin vastavaikuttaja pegvisomantilla (Fernandez-Rodriguez ym., 2015; Lodish ym., 2016). Eurooppalaisissa populaatioissa, myös Suomessa, akromegalian insidenssi on luokkaa 0,2-1,1/100 000 ja prevalenssi 2,8-13,7/100 000, ja taudin sukupuolijakauma on tasainen (Kauppinen-Mäkelin 2013, Lavrentaki ym., 2017). Tavallisimmin diagnoosi tehdään 40-50 vuoden iässä. Gigantismin esiintyvyydestä on huonommin tietoja saatavilla kuin akromegalian, mutta raportoiduista potilaista alle 19-vuotiaita on karkeasti arvioituna muutamasta muutamaankymmeneen prosenttiin (Lavrentaki ym., 2017).

1.2.2 Somatotropinoomille altistavat perinnölliset geenivirheet

Suurin osa aivolisäkkeen kasvaimista on sporadisia eli sattumanvaraisista paikallisista mutaatioista aiheutuvia, mutta noin 5 % tapauksista taustalla on perinnöllinen geenivirhe (Vandeva ym., 2010). Akromegaliaa ja gigantismia aiheuttavat perinnölliset mutaatiot liittyvät usein kasvaimen riskiä lisääviin hormonieritykseen vaikuttaviin oireyhtymiin, joita ovat ykkös- ja nelostyyppin multippelit endokriiniset neoplasiat eli MEN-oireyhtymät (MEN1 ja MEN4), Carneyn kompleksi, McCune-Albrightin oireyhtymä, X-kromosomiin kytkeytynyt akrogigantismi (X-linked acrogigantism eli X-LAG) ja paragangliooma, feokromosytooma sekä aivolisäkkeen kasvain (paraganglioma, pheochromocytoma, and pituitary adenoma association eli 3PA). Lisäksi periytyviä mutaatioita on löydetty suvuittain, ilman oireyhtymän kaltaisia piirteitä esiintyvissä aivolisäkkeen adenoomissa (familial isolated pituitary adenomas eli FIPA) (Hannah-Shmouni ym., 2016). Perinnöllisten tapausten keskeisimmät geenivirheet on koottu taulukkoon 1 ja esitelty alla.

Taulukko 1. Keskeisimmät perinnöllistä akromegaliaa aiheuttavat geenit, niiden virheisiin liittyvät taudit erityispiirteineen sekä periytymistavat.

Virheellinen geeni	HGNC- koodi	Tauti erityispiirteinen	OMIM-koodi	Periytymistapa
<i>MEN1</i>	7010	MEN1-oireyhtymä eri umpirauhasten kasvaimet	131100	autosomaalinen dominantti/sporadinen
<i>CDKN1B</i>	1785	MEN4-oireyhtymä eri umpirauhasten kasvaimet	610755	autosomaalinen dominantti
<i>GNAS</i>	4392	McCune-Albrightin oireyhtymä umpirauhasten toimintahäiriöt, luuston epämuodostumat, ihon pigmenttiläiskät	174800	sporadinen
<i>AIP</i>	358	PAP periytyvä aivolisäkkeen adenooman riski	102200	autosomaalinen dominantti/sporadinen
<i>PRKARIA</i>	9388	Carneyn kompleksi ihon pigmenttiläiskät, rauhasten ja sidekudoksen kasvaimet, PPNAD	160980	autosomaalinen dominantti
<i>GPR101</i>	14963	X-LAG varhaislapsuuden gigantismi, prolaktiinin liikaeritys	300942/300943	X-kromosomaalinen dominantti/ sporadinen
<i>SDH</i> -geeniperhe	641	3PA yhdessä esiintyvät paragangliooma tai feokromosytooma ja aivolisäkkeen adenooma	ei omaa koodia	autosomaalinen dominantti

HGNC-koodi: geenin HUGO Gene Nomenclature Committee –koodi
OMIM-koodi: taudin OMIM-koodi

MEN1

Ykköstyypin MEN-oireyhtymä on autosomaalisesti dominantisti periytyvä ja toisinaan sporadisesti esiintyvä tauti, joka altistaa kasvainten kehittymiselle eri umpirauhasissa, useimmiten lisäkilpirauhasessa, haimassa ja suolistossa tai aivolisäkkeen etuosassa (Brandi ym., 2001; Hannah-Shmouni ym., 2016). Virheellisenä oireyhtymälle altistava geeni, *MEN1* (OMIM 613733) koodaa meniini-proteiinia (Marx, 2005). Koko *MEN1*-geenin sekvenssin pituudelta on löydetty yli 1300 erilaista mutaatiota, joista useimmat ovat proteiinin lyhenemiseen tai mRNA:n hajoamiseen johtavia nonsense- ja frameshift-mutaatioita (Lemos & Thakker, 2008). Meniiniä tuotetaan useissa eri kudoksissa ja se osallistuu genomien vakauden ylläpitoon säätelemällä muu muassa transkriptiota, solunjakautumista, apoptoosia ja DNA:n korjaamista sekä kromatiinirakennetta (Balogh ym., 2006). Syndroomaan liittyvien kasvainten kehittämisessä *MEN1* toimii klassisena kasvunrajoitegeeninä.

Aivolisäkkeessä meniini säätelee kasvuhormonin ja prolaktiinin tuotantoa aktiviinin kanssa. Aktiviini hillitsee näiden hormonien tuotantoa sekä aivolisäkkeen POU1F1-transkriptiofaktorin (entiseltä nimeltään PIT1) transkriptiota ja ilmenemistä. Aktiviini vähentää meniinin avulla kasvuhormonin tuotantoa aiheuttamalla POU1F1:n, joka normaalisti aktivoi kasvuhormonin transkriptiota, nopean fosforylaation ja siten proteiinin kyvyttömyyden sitoutua DNA:han sekä estämällä *POU1F1*-geenin promootorin toiminnan (Balogh ym., 2006).

CDKN1B

MEN4-oireyhtymä on hyvin paljon MEN1:n kaltainen, ja siinä potilailla tavallisimpia ovat aivolisäkkeen ja lisäkilpirauhasen kasvaimet (Alrezk ym., 2017). Oireyhtymien samankaltaisuuden vuoksi on mahdollista, että pienellä osalla MEN1-potilaista, joilla ei ole mutaatiota *MEN1*.ssä, onkin itse asiassa MEN4 (Lemos & Thakker, 2008). MEN4:lle altistava mutaatio on heterotsygoottisena kromosomissa 12p13.1 sijaitsevassa *CDKN1B*-geenissä (OMIM 600778, toisilta nimiltään myös P27KIP1 ja KIP1), joka koodaa p27(KIP1)-proteiinia. p27(KIP1) on sykliiniriippuvainen kinaasi-inhibiittori, joka kontrolloi solunjakautumisessa erityisesti siirtymistä G1-vaiheesta S-vaiheeseen sekä solujen liikkuvuutta ja apoptoosia (Borriello ym., 2007). *CDKN1B* toimii kasvainten muodostumisessa kasvunrajoitegeeninä, joskaan ei klassisena sellaisena: toisessa alleelissa tapahtunut mutaatio, joko yksinään tai *MEN1*-mutaatioiden kanssa, riittää käynnistämään solujen epänormaalin lisääntymisen (Alrezk ym., 2017).

GNAS

GNAS-onkogeenin (OMIM 139320) mutaatiot ovat yleisimpiä sporadisen akromegalian aiheuttajia, sillä jopa 40%:ssa sporadisista somatotropinoomista esiintyy kyseisen geenin somaattinen virhe (Marques & Korbonits, 2017). Lisäksi somaattiset mutaatiot *GNAS*-geenissä varhaisessa kehitysvaiheessa aiheuttavat McCune-Albrightin oireyhtymän esiintyessään mosaiikkisina useissa kudoksissa (Weinstein ym., 1991). Taudille ovat tyypillisiä moninaiset luuston epämuodostumat, ihon pigmenttiläiskät ja useiden umpirauhasten toimintahäiriöt, joista seuraavat esimerkiksi ennenaikainen murrosikä, kilpirauhasen liikatoiminta, somatotropinooma ja lisämunuaisen liikakasvu. Akromegaliaa esiintyy noin 20%:lla potilaista (Salenave ym., 2014). Kasvuhormonin liikaeritys ei aina liity oireyhtymässä kasvaimeen, eikä erityis lakkaa osalla kasvainpotilaista edes leikkauksen jälkeen, mikä viittaisi siihen, että *GNAS*-geenin mutaatiot aiheuttaisivat hormonia erittävien solujen liikakasvua useissa pisteissä aivolisäkkeen sisällä (Vortmeyer ym., 2012).

GNAS koodaa G-proteiinin s-tyypin α -alalyksikköä eli $G\alpha_s$:a. McCune-Albright-oireyhtymässä mutaatioiden seurauksena $G\alpha_s$ menettää GTP:aasiaktiivisuutensa, jolloin adenyylisyklaasi on jatkuvasti aktivoitunut, solujen cAMP-tasot ovat koholla ja PKA aktivoitunut. Kun cAMP ei hajoa, kasvu- sekä useiden muiden hormonien tuotanto ja solunjakautuminen lisääntyvät proteiinikinaasi A – ja CREB-välitteisesti, minkä seurauksena somatotropinooma ja hormonitoiminnan häiriöt kehittyvät (Salpea & Stratakis, 2014; Marques & Korbonits, 2017)

AIP

AIP-geenin (OMIM 605555) mutaatiot altistavat aivolisäkkeen adenoomille, mistä käytetään nimitystä PAP eli pituitary adenoma predisposition (Vierimaa ym., 2006). *AIP*:n virheitä on havaittu sporadisissa sekä erityisesti suvuittain esiintyvissä aivolisäkkeen adenoomatapauksissa, joihin ei liity muiden perinnöllisten kasvaimia ja hormonien liikatuotantoa aiheuttavien oireyhtymien piirteitä; näistä suvuittain esiintyvistä kasvaimista käytetään nimeä FIPA (familial isolated pituitary adenoma). FIPA-suvut voivat olla homo- tai heterogeenisiä eli niissä voi esiintyä vastaavasti yhtä tai useampaa eri kasvaintyyppiä, joita voivat olla somatotropinoomat, prolaktinoomat, hormoneja erittämättömät kasvaimet, tyreotropinoomat ja kortikotropinoomat (Daly ym., 2010; Daly ym., 2006). Yleensä FIPA-suvuissa on kaksi tai muutamia henkilöitä, joilla on aivolisäkkeen kasvain, ja monesti he ovat ensimmäisen asteen sukulaisia. *AIP*:n mutaatiot ovat FIPAssa yleisimpiä löydettyjä geenivirheitä, varsinkin suvuissa joissa esiintyy somatotropinoomia, ja niitä on löydetty noin 20%:lla FIPA-perheistä (Daly ym., 2007). Mutaatiot periytyvät autosomaalisella dominantilla tavalla, mutta niillä on alentunut penetranssi (Vierimaa ym., 2006). FIPA-suvuissa kasvain kehittyy yleensä nuoremmalla

iällä kuin sporadisissa tapauksissa, ja *AIP*-mutaatioiden kantajilla somatotropinoomat ja gigantismi ovat verrattain yleisiä (Daly ym., 2010; Daly ym., 2007).

AIP vuorovaikuttaa soluissa useiden proteiinien, joista monet osallistuvat cAMP-viestintään, kanssa. Somatotropinoomien muodostumisessa *AIP* toimii kasvunrajoitegeeninä: Normaalisti i-tyyppin $G\alpha$ -proteiinit laskevat solujen cAMP-tasoa, mutta *AIP*:n puuttuessa $G\alpha_i$ -proteiinit ilmenevät liian vähän, jolloin cAMP:n tuotanto ja sen myötä solunjakautuminen ja hormonituotanto kiihtyvät (Tuominen ym., 2015; Formosa ym., 2013). Joillakin pistemutaatioilla on samankaltaisia vaikutuksia: niiden seurauksena *AIP* menettää kasvunrajoiteaktiivisuutensa, ja cAMP-viestintä sekä hormonieritys kiihtyvät. Pistemutaatiot myös nopeuttavat *AIP*-proteiinin hajoamista (Formosa & Vassallo, 2017).

PRKARIA

Carneyn kompleksissa esiintyy tavallisesti pigmenttiläiskiä, luomia ja myksoomia eli hyvänlaatuisia sidekudoskasvaimia ihossa ja muissa kudoksissa, kuten sydämessä ja Schwannin soluissa hermojen ympärillä. Sairastuneilla on myös kasvaimia rauhasissa, kuten aivolisäkkeessä, kiveksissä, rinnoissa, munasarjoissa ja kilpirauhasessa (Bertherat ym., 2009). Tavallista on lisäksi lisämunuaiskuorten paisuminen ja kasvaminen täyteen tummia rakkuloita, mistä käytetään nimitystä PPNAD (primary pigmented nodular adrenocortical disease), joka tosin voi esiintyä myös omana sairautenaan. Carneyn kompleksi esiintyy tavallisesti hieman useammin naisilla kuin miehillä, ja tauti voidaan diagnosoida milloin vain varhaislapsuuden ja vanhuuden välillä, mutta yleensä potilaan ollessa nuori aikuinen (Bertherat ym., 2009). Useimmiten taudin aiheuttaa kasvunrajoitegeeninä toimivan *PRKARIA*:n (OMIM 188830) suvussa kulkeva tai de novo ituradan virhe. Mutaatioon liittyvä tautipenetranssi on lähes täydellinen ja periytymistapa autosomaalinen dominantti (Bertherat ym., 2009). Suurin osa mutaatioista johtaa viallisen mRNA:n hajoamiseen ennen translaatiota ja siten proteiinin haploriittämättömyyteen, mutta mutaatioiden tuloksena voi syntyä myös virheellisiä proteiineja. Molemmissa tapauksissa solujen jakautuminen kiihtyy cAMP-viestinnän liiallisen aktivoitumisen myötä (Kirschner ym., 2000).

PRKRIA-geeni koodaa proteiinkinasi A –entsyymiin (PKA) kuuluvaa yksikköä nimeltä $R1\alpha$; normaalisti PKA koostuu neljästä eri alayksiköstä, joista osa estää ja osa katalysoi entsyymin toimintaa (Bossis & Stratakis, 2004). $R1\alpha$ on estävistä yksiköistä yksi. Neljästä alayksiköstä koostuva PKA on inaktiivinen ja aktivoituu cAMP:n vaikutuksesta, kun estävät alayksiköt irtoavat ja katalyyttiset alayksiköt jäävät jäljelle. Sekä estäviä ($R1\alpha$, $R1\beta$, $R2\alpha$ ja $R2\beta$) että katalyyttisiä ($C\alpha$, $C\beta$ ja $C\gamma$) alayksiköitä on useita erilaisia (Bossis & Stratakis, 2004). Joissakin kudoksissa, kuten

Schwannin soluissa, PKA:n inaktivoituminenkin voi johtaa solujen villiin jakautumiseen ja kasvaimiin mahdollisesti solujen erilaisesta kehitysvaiheesta tai kasvuympäristöstä riippuen (Svenningsen & Kanje, 1998).

GPR101

Mikroduplikaatiot kromosomissa Xq26.3, joka sisältää G-proteiineihin liittyvää reseptoria (G-protein coupled receptor) koodaavan geenin *GPR101* (OMIM 300393), on liitetty melko vastikään löytyneeseen tautiin nimeltä X-LAG (X-kromosomiin kytkeytynyt akrogigantismi, X-linked acrogigantism). Taudissa ovat tyypillisiä somatotropinooma tai aivolisäkkeen liikakasvu, poikkeuksellisen nopea pituuskasvu muihin gigantismitapauksiin nähden sekä prolaktiinin liikaeritys (Trivellin ym., 2014; Iacovazzo ym., 2016). X-LAG havaitaan tyypillisesti alle 5-vuotiailla pikkulapsilla ja selvästi useammin tytöillä kuin pojilla. *GPR101*:n duplikaatio voi esiintyä X-kromosomissa dominantisti periytyneenä tai sporadisena de novo –mutaationa, mutta myös somaattisena vain aivolisäkkeessä tai mosaiikkisesti eri kudoksissa (Iacovazzo ym., 2016 Hannah-Shmouni ym., 2016). Ituradan- ja somaattisia *GPR101*:n pistemutaatioita on lisäksi löydetty akromegaliapotilailta (Trivellin ym., 2014; Iacovazzo ym., 2016).

GPR101:n koodaama G-proteiineihin liittyvä reseptori ilmenee runsaasti ainakin jyrsijöiden hypotalamuksissa (Trivellin ym., 2014). Lisäksi joillakin X-LAG-potilailla GHRH:n tasot ovat kohonneet, mikä viittaisi siihen, että *GPR101* voi osallistua GHRH:n erityksen säätelyyn hypotalamuksessa (Trivellin ym., 2014; Beckers ym., 2015). *GPR101*-mutaatioihin liittyvää, kasvaimen syntyyn johtavaa patogeenista mekanismia ei vielä tarkasti tunneta, mutta Trivellin ryhmineen havaitsi *GPR101*:n ilmenemisen nousseen merkittävästi duplikaation kantajien aivolisäkkeissä sekä geenin pistemutaatioiden aiheuttavan kasvuhormonin erityksen sekä solujen jakautumisen kiihtymistä rotan aivolisäkkeen GH3-kasvainsoluissa. GH3-soluissa CRE-välitteinen cAMP-viestintä vilkastui mutaatioiden seurauksena (Trivellin ym., 2014).

SDHA, SDHB, SDHC, SDHD

Paragangliooma tai feokromosytooma ja aivolisäkkeen adenooma voivat toisinaan esiintyä samalla potilaalla tai samassa perheessä, mitä kutsutaan 3PA:ksi (3P association, joka tulee sanoista paraganglioma, pheochromocytoma and pituitary adenoma) (Xekouki ym., 2015). Paraganglioomat ovat paraganglioiden, eli verisuonten ja hermojen läheisyydessä olevien kemoreseptoreiden kasvaimia, jotka sijaitsevat tavallisesti pään ja kaulan alueella. Feokromosytoomat puolestaan ovat lisämunuaisytimen kasvaimia, jotka erittävät runsaasti katekoliamiineja. *SDH*-ryhmän geneistä

(*SDHA*, *SDHB*, *SDHC* ja *SDHD*) on löytynyt haitallisia mutaatioita sekä merkitykseltään tuntemattomia variantteja 3PA-potilailta (Denés ym., 2015; Xekouki ym., 2015). *SDH*-mutaatioita tai variantteja esiintyy varsinkin suvullisissa tapauksissa, joissa sukulaisilla tiedetään esiintyneen jokin tai joitakin 3P-kasvaimista, mutta myös sporadiset tapaukset ovat mahdollisia (Xekouki ym., 2015). Aivolisäkkeen adenoomat voivat olla ainakin hormoneita erittämättömiä, prolaktinoomia tai somatotropinoomia, ja joissakin tapauksissa GHRH:ta erittävä feokromosytooma saattaa aiheuttaa akromegaliaa (Xekouki ym., 2015; Denés ym., 2015). 3PA havaitaan tavallisesti aikuisilla ja *SDH*-mutaatiot periytyvät autosomaalisesti dominantisti (Xekouki ym., 2015; Hannah-Shmouni ym., 2016).

Sukkinaattidehydrogenaasi on neljästä alayksiköstä, joita *SDH*-geenit koodaavat, koostuva, elektroninsiirtoketjuun mitokondrioissa osallistuva entsyymikompleksi. Aivolisäkkeen adenoomissa *SDHx*-geenit ovat todennäköisesti tuumorisuppressoreja, joiden mutaatiot ja vähentynyt ilmeneminen ovat liittyneet HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) -transkriptiofaktorin pitoisuuden nousuun aivolisäkkeessä (Xekouki ym., 2015; Xekouki ym., 2012). Lisäksi 3PA-adenoomissa on esiintynyt epämuodostuneita mitokondrioita (Xekouki ym., 2015). Hypoksian eli happivajauksen kaltainen tila ja HIF-1 α :n ilmenemisen nousu voivat olla olennaisia 3PA-adenoomien muodostumisessa: HIF-1 α liittyy tavallisesti hypoksiatilan aktivoitumiseen soluissa, mihin liittyvät edelleen mitokondrioiden fuusioituminen ja fuusioituneita mitokondrioita sisältävien solujen muuttuminen vastustuskykyisiksi apoptoosille (Chiche ym., 2010).

Muut mahdolliset liiallista erityystä aiheuttavat geenivirheet

Ykköstyypin neurofibromatoosi on *NF1*-geenin perinnöllisistä mutaatioista johtuva, hermojen sidekudoskasvaimia sekä ihomuutoksia aiheuttava tauti, jonka yhteydessä on toisinaan havaittu kasvuhormonin liiallista erityystä aikuisilla ja lapsilla (Hannah-Shmouni ym., 2016). Aivoissa esiintyvät kasvaimet voivat potentiaalisesti häiritä ympäröiviä rakenteita: Liiallista kasvuhormonin tuotantoa aiheuttavan mekanismin on ehdotettu liittyvän näköhermojen kasvainten tunkeutumiseen aivolisäkkeen solujen sisään, mikä saattaisi estää kasvuhormonin erityksen säätelyn (Hannah-Shmouni ym., 2016).

1.3 *KCNQ1* & *KCNE2*

1.3.1 *KCNQ1*:n ja *KCNE2*:n muodostamat kaliumkanavat

KCNQ1 (Kv7.1) on yksi kaliumkanavien α -yksiköitä muodostavaan geeniperheeseen kuuluvista proteiineista. Se muodostuu kuudesta (S1-S6) rakenneyksiköstä, joista yksiköt S1-S4 muodostavat kalvojännitteen muutoksia havaitsevan osan ja S5 ja S6 kanavan keskellä sijaitsevan huokosrakenteen, jonka läpi K^+ -ionit kulkevat sisään tai ulos solusta (Abbott, 2014). Yhden toimivan kanavan muodostamiseen solukalvolla tarvitaan neljä *KCNQ1*-proteiinia ja usein yksi tai useampi *KCNE*- β -alayksiköistä *KCNE1*-*KCNE5* (Abbott, 2014). *KCNQ1* ilmenee sydämessä ja useissa epiteelikudoksissa, kuten vatsan suolahappoa erittävissä soluissa, munuaisissa, kilpirauhasessa, suolistossa, hengitysteissä sekä aivolisäkkeessä (Liin ym., 2015; Tommiska ym., 2017). Beta-alayksiköt muokkaavat *KCNQ1*-*KCNE*-kanavien avautumisherkkyyttä ja ioniläpäisevyyttä, minkä ansiosta *KCNQ1*-*KCNE*-kaliumkanavilla on laaja kirjo fysiologisia rooleja eri kudoksissa: Ne osallistuvat ominaisuuksistaan riippuen ionien ja hormonien kuljetukseen tai aktiopotentiaalin syntyyn (Liin ym., 2015). Joissakin solutyypeissä *KCNQ1*-kanavat ovat jänniteherkkiä ja aukeavat solukalvon depolarisaation seurauksena ja joissakin ne taas ovat jatkuvasti auki. *KCNQ1*-geeni sijaitsee kromosomissa 11p15, jossa *KCNQ1*:n kattava alue on normaalisti useimmissa kudoksissa leimautunut isältä perityssä kromosomissa (Abbott, 2014).

KCNE2 puolestaan kuuluu *KCNE*-geeniperheeseen, jonka kaikki jäsenet ovat yhdestä rakenneyksiköstä muodostuvia kalvoproteiineja (Abbott, 2015). Vastaavasti, kuten *KCNQ1* voi sitoutua minkä tahansa *KCNE*-perheen jäsenen kanssa, *KCNE2* voi sitoutua useisiin kaliumkanavien α -yksiköihin. Yhteen *KCNQ1*-proteiinien muodostamaan tetrameeriin sitoutuu kaksi *KCNE2*-proteiinia (Abbott, 2015). *KCNE2* sijoittuu *KCNQ1*-kanavissa segmenttien S5 ja S6 väliin (Li ym., 2014). *KCNE2*:n kanssa *KCNQ1* muodostaa erityisesti jatkuvasti auki olevia kanavia epiteelisoluissa: Näiden kanavien tähän mennessä tunnettuihin tehtäviin kuuluvat muun muassa K^+ -ionien kierrättäminen sisään ja ulos suolahappoa erittävissä vatsan epiteelisoluissa, mikä on välttämätöntä vatsahapon erityksessä; kilpirauhashormonin synteesissä tarvittavien Na^+ - ja I^- -ionien sisäänotto kilpirauhasessa ja mahdollisesti aktiopotentiaalin säätely sydänlihassoluissa; ainakin *KCNQ1*:n ja *KCNE2*:n tiedetään molempien ilmenevän sydämessä muihin kaliumkanavaproteiineihin kuin toisiinsa sitoutuneina (Abbott ym., 2015).

1.3.2 *KCNQ1*-geenin mutaatioiden yhteys kasvuhormonivajeeseen

Tavallisimmin *KCNQ1*:n pistemutaatiot on liitetty ihmisillä pitkä-QT- ja lyhyt-QT-oireyhtymiin, joissa sydämen QT-intervallit ovat vastaavasti pidentyneet ja lyhentyneet, sekä rytmihäiriöihin (Hedley ym., 2009). Lisäksi *KCNQ1*:n mutaatioiden tiedetään aiheuttavan kuuroutta ja Jervell-Lange-Nielsenin oireyhtymää (Abbott, 2014). *KCNE2*:n mutaatioilla on niin ikään löytynyt yhteys pitkä-QT-oireyhtymään (Hedley ym., 2009). Tieto *KCNQ1*:n mutaatioiden aiheuttamien tautien joukosta laajeni hiljattain, kun tutkimusryhmämme löysi *KCNQ1*-geenistä kaksi uutta kasvuhormonivajetta ja äidiltä perittyä ienten liikakasvua aiheuttavaa missense-mutaatiota (Tommiska ym., 2017). Potilaiden fenotyypit vaihtelivat jopa kaksosten välillä lievästä kasvuhormoni- tai IGF-1-vajeesta useiden aivolisäkkeen hormonien vajeisiin. Ienten liikakasvun lisäksi useilla kasvuhormonivajeesta kärsivillä oli erikoiset kasvonpiirteet, kun mutaatio oli peritty äidiltä: Heillä oli leveä nenä ja/tai korkeakaarinen kitalaki, paksut korvalehdet tai kuppimaiset korvat. Osalla esiintyi myös hypogonadotrooppiseen hypogonadismiin viittaavia murrosikäkehityksen tai hedelmällisyyden ongelmia ja joillakin sydämen QT-ajan pituus oli lyhentynyt; itse asiassa kahdella sairastuneista oli lyhyt QT-oireyhtymä. Kasvuhormonivaje näytti periytyvän autosomaalisesti dominantisti, mutta sydämen fenotyypin penetranssi oli epätäydellinen ja sen ilmenemisaste vaihteli.

Solukokeissa testattiin mutaatioiden vaikutusta kaliumkanavien elektrofysiologisiin ominaisuuksiin: molemmat mutaatiot kasvattivat solukalvon läpi kulkevaa sähkövirtaa ilman *KCNQ1*:n toiminnallisten alayksiköiden läsnäoloa, ja saman aiheuttivat myös *KCNE1*-alayksikkö ja toinen *KCNQ1*:n mutaatio sekä *KCNE2*-alayksikkö kumman tahansa *KCNQ1*:n mutaation kanssa. Toisin sanoen *KCNE2*:n sitoutuessa jompaakumpaa mutaatiota kantavan *KCNQ1*:n kanssa nämä proteiinit vaikuttaisivat muodostavan jatkuvasti auki olevia ionikanavia, mikä sopii yhteen aiempien havaintojen kanssa (Abbott, 2015). Lisäksi kummatkin *KCNQ1*:n mutaatiot *KCNE2*:n kanssa vähensivät hormonieritystä hiiren aivolisäkkeen kasvainsolulinjan soluissa. *KCNQ1*:n havaittiin ilmenevän hiiren somatotrooppien ja gonadotrooppien solukalvoilla sekä ihmisen aivolisäkkeessä, hiiren GHRH-neuroneissa sekä ihmisen hypotalamuksessa ja hiiren aivolisäkkeen verisuonten seinämissä. *KCNE2* ilmeni ihmisen aivolisäkkeessä ja hypotalamuksessa (Tommiska ym., 2017).

KCNQ1 ja *KCNE2* vaikuttaisivat siis osallistuvan kasvuhormonin erityksen säätelyyn, vaikka niiden vaikutuksen tarkka mekanismi onkin vielä tuntematon. Koska *KCNQ1* ja *KCNE2* ilmenevät sekä aivolisäkkeessä että hypotalamuksessa, ne saattavat säädellä kasvuhormonin eritystä joko

somatotroopeissa tai hypotalamuksesta erittyvien hormonien välityksellä. KCNQ1:llä voi niin ikään olla jotain tekemistä somatotrooppisolujen verisuonituksen ja siten aineenvaihdunnan kanssa.

1.3.3 *KCNQ1*:n ja *KCNE2*:n mahdollinen osallistuminen somatotropinoomien syntyyn

On mahdollista, että jotkin mutaatiot *KCNQ1*:ssä tai *KCNE2*:ssa voisivat aiheuttaa myös kasvuhormonin liiallista eritystä: kaliumkanavia koodaavat geenit voivat nimittäin osallistua kasvainten muodostumiseen, kuten angiogeneesiin, solujen jakautumiseen sekä kasvaimen leviämiseen (Pardo & Stühmer, 2013). Esimerkiksi Rapetti-Mauss kollegoineen havaitsivat *KCNQ1*:n olevan Wnt/ β -kateniinisignaloinnin säätelijä ja kohdegeeni: *KCNQ1*:n ilmeneminen hiljensi Wnt/ β -kateniinisignalointia paksusuolen syövässä sekä sääteli β -kateniinin stabiiliutta ja niiden solunsisäistä jakautumista. Vastaavasti Wnt/ β -kateniinisignalointi hiljensi *KCNQ1*:n ilmenemistä, mikä johti syöpäsolujen jakautumiseen ja epiteeli-mesenkymaaliseen transitoon, jonka myötä syöpäsolut muuttavat fenotyyppiään ja voivat levitä uusiin paikkoihin (Rapetti-Mauss ym., 2017).

Rapetti-Maussin ja kollegoiden tutkimus paljasti *KCNQ1*:n ilmenemisen olevan myös suoraan verrannollinen β -kateniinin kanssa solukalvolla komplekseja muodostavan E-kadheriinin ilmenemiseen: Kun *KCNQ1*:n ilmeneminen väheni, E-kadheriini siirtyi β -kateniinin kanssa solukalvolta solulimaan. E-kadheriinin ilmenemisen on havaittu vähentyneen ja sen solunsisäisen jakautumisen muuttuneen somatotropinoomissa (Fougner ym., 2010). Muutokset E-kadheriinin ilmenemisessä ja solunsisäisessä jakautumisessa (erityisesti siirtymisessä solukalvolta solulimaan) ovat aiemmin olleet yhteydessä kasvainten poikkeuksellisen suureen kokoon ja aggressiivisuuteen (Fougner ym., 2010).

Wnt-signaloinnin inhibiittoreiden ilmenemisen tiedetään vähentyneen paksusuolen syövän lisäksi somatotropinoomissakin (Elston ym., 2008; Elston ym., 2010). Lisäksi Wnt-viestinnän aktivoituminen voi johtaa kraniofaryngioomien, eli aivolisäkkeen esi-/kantasoluista alkunsa saavien kasvainten, syntyyn (Gaston-Massuet ym., 2011). *KCNQ1* saattaisi siis osallistua aivolisäkkeen kasvainten muodostumiseen Wnt-signaalireitin ja/tai epiteeli-mesenkymaalisen transition kautta. Harvinaisissa tapauksissa GHRH:n liiallinen tuotanto voi liittyä akromegaliaan ja/tai gigantismiin, ja koska *KCNQ1* näyttäisi ilmenevän hypotalamuksessa, on myös mahdollista, että *KCNQ1* osallistuisi GHRH:n erityksen sähköiseen säätelyyn (Zimmerman ym., 1993; Beckers ym., 2015; Balthasar ym., 2003; Tommiska ym., 2017). Ryhmämme alkuperäisessä tutkimuksessa affiniteettikromatografia-

massaspektrometria-analyysi paljasti lisäksi sähköisen toiminnan ulkopuolelta KCNQ1:n proteiini-proteiini-vuorovaikutuksia, jotka liittyivät muun muassa makromolekyylien kuljetukseen, silmukointiin ja proteiinien glykosylaatioon (Tommiska ym., 2017).

KCNE2 puolestaan vaikuttaisi olevan tärkeä eritystoiminnassa ja solujen jakautumisessa monissa kudoksissa: Se esimerkiksi muodostaa KCNQ1:n kanssa suolahapon eritykseen osallistuvia kaliumkanavia vatsan parietaali- eli suolahappoa erittävissä soluissa ja osallistuu lisäksi vatsan erittävien solujen lisääntymiseen (Abbott & Roepke, 2016; Roepke ym., 2010). KCNE2:n vähentyneellä ilmenemisellä ja mahasyövällä on myös löydetty yhteys (Roepke ym., 2006). Sama proteiini on osallisena niin ikään kilpirauhashormonin synteesissä sekä insuliinin erityksessä (Roepke ym., 2009; Lee ym., 2017).

1.4 Työn tarkoitus

Tutkimusryhmämme on löytänyt aiemmin *KCNQ1*-geenistä kaksi uutta kasvuhormonivajeeseen sekä ienten liikakasvuun kytkeytyntä missense-mutaatiota, mutta KCNQ1:n ja sen alayksiköiden merkitys kasvuhormonin erityksen säätelyssä on vielä pitkälti tuntematon. Erityisesti alayksikkö KCNE2 vaikuttaisi osallistuvan hormonierityksen säätelyyn. Tämän työn tarkoituksena oli selvittää, löytyykö 45 suomalaiselta somatotropinoomapotilaalta, jotka edustavat kasvuhormonivajeelle vastakkaista fenotyyppiä eli kasvuhormonin liikaeritystä, ituradan mutaatioita *KCNQ1*- ja *KCNE2*-geeneistä. Tarkoitus oli saada tietoa, voisiko näiden geenien periytyvillä mutaatioilla ja somatotropinoomilla olla yhteys. Selvitystyö tapahtui etsimällä mutaatioita akromegaliapotilailta Sanger-sekvensoinnilla sekä ennustamalla löytyneiden muutosten vaikutukset proteiinien toimintaan *in silico* -työkaluilla. Kasvuhormonin eritystoiminnan häiriöitä aiheuttavien geenivirheiden tunteminen auttaa ymmärtämään niihin liittyvien sairauksien kehitystä, ja lisääntynyt tieto helpottaa diagnosointia, perinnöllisyysneuvontaa sekä oikeanlaisen hoidon antamista. Sekä kasvuhormonin liika- että vajaaeritys lisäävät riskiä merkittäviin terveysongelmiin ja johtavat yleisen elämänlaadun laskuun (Ayuk & Sheppard, 2006; Batty ym., 2009). Mitä paremmin yksilöllistä hoitoa osataan antaa, sitä paremmat mahdollisuudet geenivirheitä kantavilla on täysipainoiseen elämään.

2 Aineisto ja menetelmät

2.1 Työn kulku tiivistetysti

Monistin PCR:llä 45:n akromegaliapotilaan DNA:ta *KCNQ1*- ja *KCNE2*-geenien eksonit kattavilla alukkeilla, puhdistin PCR-tuotteet ja vein tuotteet Sanger-sekvensoitaviksi FIMM:n laboratorioon.

Sekvensoinnin jälkeen etsin kromatogrammeista sekvenssimuutoksia näistä geeneistä, tarkistin muutosten esiintyvyydet ExAC-, 1000G- ja dbSNP-, gnomAD- ja EVS-tietokannoista ja ennustin niiden vaikutukset silmukointiin tai proteiinin toimintaan Human Splicing Finder -, MutationTaster-, Polyphen-2- ja SIFT-ohjelmilla *in silico*. Ensisijaisesti tarkoitukseni oli etsiä tietokannoissa aiemmin raportoimattomia ja haitallisia mutaatioita, jotka saattaisivat aiheuttaa periytyvän alttiuden somatotropinooman kehittymiselle.

2.2 Potilasaineisto

Sain laimennokset potilaiden verestä eristetystä DNA:sta projektia varten FT Auli Karhulta. Yksi potilaista oli italialainen ja kaikki muut suomalaisia. Kaikilla oli somatotropinooma ja akromegalia, eikä kenelläkään ollut tunnettuja perinnölliselle akromegalialle altistavia geenivirheitä. Italialaisen potilaan siskolla oli ollut kasvuhormonia ja prolaktiinia erittävä adenooma, mutta muilla potilailla ei ollut perhehistoriaa kasvaimista. Kaikki tutkimukseen osallistuneet olivat näytteiden keräämishetkellä yli 15-vuotiaita, ja he olivat antaneet kirjalliset, tietoon perustuvat suostumuksensa tutkimukseen osallistumisesta ja omien näytteidensä käytöstä.

2.3 PCR-olosuhteiden optimointi ja alukkeiden testaus

Selvitin geenien eksonit Ensembl-tietokannasta (tietokannan 90. julkaisu, <https://www.ensembl.org/index.html>) ihmisgenomin GRCh38.p10 (GCA_000001405.25) – kokoonpanosta, ja suunnittelin alukkeet Primer3-online-ohjelmalla (<http://simgene.com/Primer3>) (Zerbino ym., 2018; Untergasser ym., 2012). Alukkeet tilattiin Sigma-Aldrichilta (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Yhdysvallat), ja ne on esitetty taulukoissa 2 ja 3.

Kokeilin ensin alukkeiden ja PCR:n toimivuutta Suomen Punaiselta Ristiltä saadun sattumanvaraisen verinäytteen DNA:lla ihanteellisten olosuhteiden ja onnistuneeseen reaktioon tarvittavien DNA- ja alukemäärien löytämiseksi, sillä varsinaisessa työssä käytettävät potilasnäytteet olivat rajalliset. Lähtökohtana oli taulukon 5 PCR-ohjelma ja taulukon 4 sekoitussuhteet. Lähdin kasvattamaan DNA:n määrää alun perin 5 ng:sta ylöspäin, ja riittäväksi määräksi osoittautui 10 ng. Alukkeiden määräksi eksonien monistamiseen riittivät taulukossa 4 esitetyt määrät, mutta *KCNQ1*:n pitkän ensimmäisen eksonin monistamiseen tarvittiin tuplamäärä alukkeita 1ATG, 1a ja 1b. Näiden kolmen alukkeen kanssa myös betaiinilisä osoittautui tarpeelliseksi. *KCNQ1*:n 1ATG-alukkeiden sekä *KCNE2*:n alukkeiden kanssa valitsin PCR-ohjelman sitoutumislämpötilaksi 62 °C, koska se oli lähimpänä näiden alukkeiden laskennallista sitoutumislämpötilaa.

2.4 PCR eli polymeraasiketjureaktio

Tein PCR-reaktioseosta kullekin eksonille jokaiselta potilaalta 22 µl, joka koostui seuraavista osista: MQ-vettä 16,525 µl; 2,5 µl 10-kertaista GeneAmp® PCR-puskuria (15 mM MgCl₂) (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, Yhdysvallat), dNTP-seosta 0,375 µl (10 mM jokaista nukleotidia) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Yhdysvallat), sekä F- että R-suuntien alukkeita 0,25 µl (20 µM) kutakin, 0,1 µl AmpliTaq Gold®-DNA-polymeraasia (5 U/µl) (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, Yhdysvallat) ja DNA:ta 10 ng. Eksonien 1ATG, 1a sekä 1b kanssa lisäksi seokseen 5M betaiinia, loppukonsentraatiolla 1M (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Yhdysvallat), jolloin vastaavasti vähensin veden määrää. Lisäksi näiden eksonien kanssa lisäksi tuplamäärän alukkeita, toisin sanoen 0,50 µl. PCR-reaktioseoksen koostumus betaiinin kanssa ja ilman on esitetty taulukossa 4.

Eksonien monistamiseen käytetyssä PCR-ohjelmassa lämpötilaa nousi aluksi 95 celsiusasteeseen 10 minuutiksi AmpliTaq Gold®-DNA-polymeraasin aktivoimiseksi. Tämän jälkeen alkavissa monistussykleissä denaturaatiolämpötila, jossa kaksijuosteinen DNA hajoaa yksijuosteiseksi, oli myös 95 °C. Sykliä seuraavassa vaiheessa lämpötila laski, jotta alukkeet sitoutuisivat monistettavaan DNA:han; tähän käytetty lämpötila oli 59 °C lukuun ottamatta *KCNQ1*:n aluketta 1ATG sekä *KCNE2*:n alukkeita, joiden sitoutumislämpötila oli 62 °C. Monistussyklin viimeisessä vaiheessa entsyymillä suorittama vastinjuosteiden kopioiminen tapahtui 72 celsiusasteessa. Jokainen syklin kolmesta vaiheesta kesti minuutin, minkä jälkeen koko sykli alkoi alusta. Yhteensä syklejä ohjelmassa oli 35. Ohjelman päätteeksi lämpötila pysyi 72 °C:ssa 10 minuuttia, jotta kaikki mahdollisesti jäljellä oleva yksijuosteinen DNA:n kopioituisi loppuun. PCR:n perusohjelma on esitetty taulukossa 5.

Tarkistin eksonien monistumisen onnistumisen 100 V ja 20 minuutin geelielektroforeesilla 1,5 % agarosigeelissä. Käytin jokaista PCR-tuotetta elektroforeesissa 10 µl, johon lisäksi 2 µl 6-kertaista latauspuskuria (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Yhdysvallat).

Taulukko 2. *KCNQ1*:n seulonnessa käytetyt alukkeet. Tähdellä* merkittyjen alukkeiden kanssa käytin 5M betaiinia. F=forward, R=reverse.

Eksoni	Alukkeiden sekvenssit	PCR-tuotteen koko (bp)
1ATG*	F: 5' GTGGCTGCCCCGCACT 3' R: 5' ACCCCAGCGCTTCCTCT 3'	138
1a*	F: 5' CCCTCCTCGTTATGGCCG 3' R: 5' TGCTGTAGATGGAGACGCG 3'	297
1b*	F: 5' CCCTTCTCGCTGGAGCTG 3' R: 5' ACTTCCTTCCCTCCTCTGCT 3'	409
2	F: 5' AATGGATGACTGGGTTTTTCG 3' R: 5' TATCAGGGCAGGACCAATGT 3'	363
3	F: 5' AGCATGGCTGGGTTCAAA 3' R: 5' ACTCCATCTGGTAGGGGTCA 3'	300
4	F: 5' ACGAGAGCAGGGTGTATGCT 3' R: 5' GTGGATGGGGCGTGAGAC 3'	246
5	F: 5' AGGGACACCCATGCCATC 3' R: 5' CGCATCTCAAGCTGTCCTAGT 3'	277
6	F: 5' GCCACTTACCGGAGTTGTGA 3' R: 5' CAAGACACCAGTGCCCAGAT 3'	399
7	F: 5' TCATCAGAGTGGTGGGTTTG 3' R: 5' CGTAAGTGGGTCTGCTCACA 3'	293
8	F: 5' ATACCTGGCCTTCCCACAAC 3' R: 5' CCAATGATGGTTCTGACAGG 3'	291
9	F: 5' GGGGAGCTGTAGCTTCCATA 3' R: 5' AGCCAAATGCATGGTGAGAT 3'	300
10	F: 5' CTGCCCTGTCTCTGTGTGAA 3' R: 5' GGAGAAACTCACTGGCTTGC 3'	400
11	F: 5' ACTGATTGTCAGGGCTGGAG 3' R: 5' TGGGCACTAGGCGAGTAGAT 3'	376
12	F: 5' TCTGGAAGGATCCAGTCTGC 3' R: 5' CTCCACTATGGGCAGGAGAG 3'	279
13	F: 5' AACCAGGCTTATGCCATCAC 3' R: 5' GGTGGTTGAGAGGCAAGAAC 3'	362
14	F: 5' CCCAGAGTGGGTGGACAGT 3' R: 5' ATGGCCCATTCTGACATCAT 3'	269
15	F: 5' TGTCCTAGTAGGTTTAGGCATTTTG 3' R: 5' CTTACGTTACACGCAGAC 3'	281
16	F: 5' GTTGGCACCTTCCCTTCTCT 3' R: 5' ACTCTTGGCCTCCCCTCTC 3'	391

Taulukko 3. *KCNE2*:n seulonnassa käytetyt alukkeet.

Eksoni	Alukkeiden sekvenssit	PCR-tuotteen koko
2	F: 5' TATACCCTGGCATCTCCCTC 3' R: 5' CTCAACAGAGAGCAAGGAAC 3'	599

Taulukko 4. PCR-reaktioseoksen koostumus ilman betaiinia ja betaiinin kanssa. *KCNQ1*:n eksonien 1ATG, 1a ja 1b alukkeiden määrät olivat kaksinkertaiset ja ne on ilmoitettu sulkeissa.

Ainesosa	Ilman betaiinia		Betaiinin kanssa	
	Määrä 22 µl:n reaktiossa	Loppu-konsentraatio	Määrä 22 µl:n reaktiossa	Loppu-konsentraatio
10x puskuri (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1x	2,5 µl	1x
dNTP mix (kukin nukleotidi 10 mM)	0,375 µl	0,15 mM	0,375 µl	0,15 mM
Forward-suunnan aluke (20 µM)	0,25 (0,50) µl	0,2 (0,4) µM	0,25 (0,50) µl	0,2 (0,4) µM
Reverse-suunnan aluke (20 µM)	0,25 µl	0,2 µM	0,25 µl	0,2 µM
AmpliTaq Gold® DNA-polymeraasi (5 U/µl)	0,1 µl	0,02 U/µl	0,1 µl	0,02 U/µl
Templaatti-DNA (5 ng/µl)	2,0 µl	10 ng/reaktio	2,0 µl	10 ng/reaktio
Betaiini (5M)	—	—	5 µl	1M
Steriili vesi	16,525 µl		11,525 µl	
Lopputilavuus	22 µl		22 µl	

Taulukko 5. PCR:n perusohjelma. Eksonin 1ATG sekä *KCNE2*:n eksonin 2 kanssa käytetty alukkeiden sitoutumislämpötila oli 59 °C:n sijasta 62 °C.

Lämpötila	Kesto	
+ 95 °C	10 min	
+ 95 °C	1 min	} 35 sykliä
+ 59 (62) °C	1 min	
+ 72 °C	1 min	
+ 72 °C	10 min	
+ 4 °C	∞	

2.5 Sanger-sekvensointi

PCR:n jälkeen puhdistin lopputuotteet sekvensointia varten lisäämällä 5 µl:aan jokaisen potilaan PCR-tuotetta 2 µl ExoProStar-reagenssia (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA). Sitten annoin seoksen inkuboitua 37 °C:ssa 15 minuuttia, jonka aikana reagenssi poisti käyttämättömät nukleotidit ja alukkeet. Inkubointi jatkui 80 °C:ssa vielä toiset 15 minuuttia ExoProStarin inaktivoimiseksi. Varsinaista sekvensointireaktiota varten otin puhdistettua PCR-tuotetta 2 µl ja lisäsin siihen 0,7 µl 5 µM F-suunnan aluketta. Sitten vein näytteet sekvensoitaviksi FIMM:n laboratorioon, jossa sekvensointi tapahtui käyttämällä ABI BigDyeTerminator Cycle Sequencing -kittiä (v3.1) ja ABI Prism 3730xl DNA Analyzer –sekvensoijaa (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, Yhdysvallat).

2.6 Sekvenssien tarkistus

Käytin sekvenssien linjauksessa ja tarkistuksessa Sequencher®-ohjelmaa (v. 5.4.6) (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, Yhdysvallat). Linjausta varten käytin Ensembl-tietokannan referenssisekvenssejä ihmisen genomien uusimmasta versiosta (Human GRCh38.p10). Tarkistin kunkin eksonin sekä niitä reunustavat introniset sekvenssit noin sadan emäsparin matkalta eksonin molemmiin puolin. Tarkistin sitten MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>) –ohjelmalla, oliko löytyneet mutaatiot raportoitu aiemmin Exome Aggregation Consortium (ExAC, <http://exac.broadinstitute.org/>) –, 1000 Genomes Project (1000G, <http://www.internationalgenome.org/home>) – ja Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) –tietokannoissa (Schwarz ym., 2014; Lek ym., 2016; 1000 Genomes Project Consortium ym., 2015; Sherry ym., 2001). Jos muutos ei löytynyt näistä, katsoin vielä, löytyykö se Exome Variant Server (EVS) (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) – ja Genome Aggregation Database (gnomAD; <http://gnomad.broadinstitute.org/>) –tietokannoista (Exome Variant Server 2018; Lek ym., 2016). Katsoin vielä kaikkien muutosten frekvenssit yleisessä populaatiossa gnomAD:stä.

2.7 Synonyymisten ja intronisten mutaatioiden vaikutusten ennustus

Työkaluni koodaavan alueen ei-synonyymisten ja intronisten mutaatioiden vaikutusten ennustamisessa olivat Human Splicing Finder 3.0 (HSF, <http://www.umd.be/HSF3/>), joka ennustaa mutaatioiden vaikutukset silmukointiin, ja MutationTaster (Desmet ym., 2009). Human Splicing Finder tunnistaa erilaisten algoritmien avulla silmukoinnille tärkeät kohdat: vastaanottavat ja luovuttavat pujontakohdat (donor and acceptor sites), silmukoinnin tehostaja- ja hiljentäjäsekvenssit

sekä haarakohdat (branch points). Ohjelmalle annetaan geenin referenssisekvenssi joko manuaalisesti tai sen tietokantoihin (Ensembl tai NCBI) rekisteröity tunnus sekä löytynyt mutaatio standardimuodossa. Sitten ohjelma laskee muutoksen todennäköisen vaikutuksen silmukointiin. Suoritin analyysin ohjelman oletusarvoilla Analyse mutation(s) –analyysityypillä, ja referenssisekvenssinä oli Ensembl-tietokannasta löytyvä *KCNQ1*:n pisin transkripti ENST00000155840 (*KCNE2*-geenistä ei löytynyt intronisista mutaatioita).

MutationTaster puolestaan hyödyntää Bayesin luokittelijaa mutaation laadun määrittelyssä, ja se laskee muutosten todennäköiset vaikutukset laajan, yli 390 000 tautimutaation sekä yli 6,8 miljoonan SNP- ja indel-polymorfismien testiaineiston perusteella. MutationTaster ilmoittaa ennustuksessaan muutoksen yleisyyden ja esiintymisen ExAC-, dbSNP- ja 1000G-tietokannoissa, konservoituneisuuden sekä sekvenssi- ja aminohappomuutokset. Ohjelmalle annetaan geenin jostakin tietokannasta (Ensembl, NCBI tai HGNC) löytyvä tunnus, jonka mukaan valitaan geenistä haluttu transkripti sekä sekvenssin tyyppi (koodaavan alueen sekvenssi (open reading frame eli ORF), cDNA tai genomisen sekvenssi). Sitten kirjoitetaan löytynyt muutos emästasolla sekä jonkin verran sekvenssiä sen molemmiin puoliin. Analyysiin valitsin *KCNQ1*:n saman transkriptin kuin HSF-analyysissäkin (ENST00000155840) ja sekvenssityypiksi genomisen sekvenssin.

2.8 Ei-synonyymisten mutaatioiden vaikutusten ennustus

Ainoan, *KCNE2*-geenistä löytyneen, ei-synonyymisen koodaavan alueen mutaation vaikutuksen ennustin MutationTaster-ohjelmalla, kuten edellä on kuvattu, käyttäen referenssisekvenssinä geenin ENST00000290310-transkriptia, sekä SIFT- ja Polyphen-2-ohjelmilla ohjelmien oletusarvoilla. SIFT (”Sorting Intolerant From Tolerant”) (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html) ja Polyphen-2 (”Polymorphism Phenotyping v2”) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) ennustavat emäsmuutoksen vaikutuksen proteiinin toimintaan (Kumar ym., 2009; Adzhubei ym., 2010). SIFT-ohjelmalle annetaan proteiinin Ensembl-tietokannan ENSP-alkuinen tunnus (ENSP00000290310), aminohappopositio ja positiossa tapahtunut muutos. Ohjelma vertaa homologisia aminohapposekvenssejä keskenään linjaamalla ne, ja laskee linjauksen perusteella muutoksen normalisoidun todennäköisyyden kullekin aminohappopositiolle. Jos näin laskettu todennäköisyys positiota kohti on alle 0,05; muutos on todennäköisesti haitallinen. SIFT ennustaa käyttäjän valinnan mukaan yhden, useamman tai kaikkien eri aminohappojen vaikutukset proteiiniin samassa positiossa. Käytin analyysissäni kaikkien eri aminohappojen vaikutukset ennustavaa vaihtoehtoa.

Polyphen-2-sovellukselle puolestaan syötetään joko pistemutaation dbSNP-tietokannan rs-koodi, jostakin ohjelman tukemasta tietokannasta (UniProtKB, RefSeq tai Ensembl) löytyvä proteiinin koodi tai manuaalisesti proteiinin FASTA-muotoinen aminohapposekvenssi ja siinä tapahtunut muutos. Käytin analyysissä mutaation rs2234916-koodia. Polyphen-2 vertaa proteiinin sekvenssiä tietokannoista löytyvien homologisten sekvenssien kanssa ja ennustaa vertailun perusteella, miten todennäköinen muutos kyseisessä positiossa on, ja onko muutos proteiinin toimintaa oleellisesti muuttava. Lisäksi ohjelma arvioi muutoksen todennäköisen vaikutuksen proteiinin kolmiulotteiseen rakenteeseen, kuten ytimen rakenteen säilymiseen tai ligandien sitoutumiseen. Polyphen-2 luokittelee analyysin tulokset niihin liittyvien väärin positiivisten asteiden perusteella kolmeen luokkaan: hyvänlaatuisiin, mahdollisesti haitallisiin ja todennäköisesti haitallisiin muutoksiin. Ohjelma ilmoittaa lisäksi muutoksen sensitiivisyyden ja spesifisyyden, ja laskee tulokselle myös numeerisen arvon. Mitä lähempänä arvo on yhtä, sitä todennäköisemmin muutos on haitallinen.

3 Tulokset

KCNQ1- ja *KCNE2*-geenien eksonit ja eksonien ja intronien rajakohdat sekvensoitiin. Tarkistin löytyneiden muutosten esiintyvyyden MutationTaster –työkalun avulla ExAC-, 1000G- ja dbSNP-tietokannoista sekä erikseen gnomAD-, ja EVS-tietokannoista. Löytyneet muutokset *in silico* -ennusteineen on esitetty taulukossa 6. Varianttien frekvenssit on ilmoitettu gnomAD:n koko tietokannan yleisten frekvenssien mukaan.

Taulukko 6. *KCNQ1*- ja *KCNE2*-geeneistä löytyneet muutokset.

		Monellako potilaalla	Esiintyminen			
Geeni	Muutos	(hom/het) ^a	tietokannoissa ^b	MAF ^d	<i>In silico</i> -ennustus (Human Splicing Finder/MutationTaster)	
<i>KCNQ1</i>	c.387-51T>C	0/8	raportoitu	rs192393524	0.0077	ei todennäköistä vaikutusta silmukointiin/polymorfismi
<i>KCNQ1</i>	c.477+86_88delGG	13/28	raportoitu ^c	rs566926544	-	ei todennäköistä vaikutusta silmukointiin/polymorfismi; silmukointikohta ja proteiinin ominaisuudet voivat muuttua
<i>KCNQ1</i>	c.478-24G>A	0/1	raportoitu	rs375027164	0.00056	ei todennäköistä vaikutusta silmukointiin/polymorfismi; silmukointikohta ja proteiinin ominaisuudet voivat muuttua
<i>KCNQ1</i>	c.781-117A>G	1/1	raportoitu	rs41282926	0.020	ei todennäköistä vaikutusta silmukointiin/polymorfismi; silmukointikohta ja proteiinin ominaisuudet voivat muuttua
<i>KCNQ1</i>	c.781-99A>G	0/15	raportoitu	rs4930127	0.36	ei todennäköistä vaikutusta silmukointiin/polymorfismi
<i>KCNQ1</i>	c.1394-14C>T	0/1	raportoitu	rs28730758	0.011	ei todennäköistä vaikutusta silmukointiin/polymorfismi; silmukointikohta ja proteiinin ominaisuudet voivat muuttua
<i>KCNQ1</i>	c.1394-39T>G	0/11	raportoitu	rs739502	0.12	ei todennäköistä vaikutusta silmukointiin/polymorfismi; silmukointikohta ja proteiinin ominaisuudet voivat muuttua
<i>KCNQ1</i>	c.1514+50C>G	0/1	raportoitu	rs199948521	0.0015	ei todennäköistä vaikutusta silmukointiin/polymorfismi; silmukointikohta ja proteiinin ominaisuudet voivat muuttua
<i>KCNQ1</i>	c.1514+46A>G	6/23	raportoitu	rs760419	0.45	ei todennäköistä vaikutusta silmukointiin/polymorfismi
<i>KCNQ1</i>	c.1514+18C>T	0/1	raportoitu	rs12577654	0.0090	ei todennäköistä vaikutusta silmukointiin/polymorfismi; silmukointikohta ja proteiinin ominaisuudet voivat muuttua
<i>KCNQ1</i>	c.1590+14T>C	0/13	raportoitu	rs11024034	0.085	ei todennäköistä vaikutusta silmukointiin/polymorfismi
<i>KCNQ1</i>	c.1685+36A>G	22/9	raportoitu	rs163150	0.67	ei todennäköistä vaikutusta silmukointiin/polymorfismi
<i>KCNQ1</i>	c.1732+43T>C	4/18	raportoitu	rs81204	0.22	ei todennäköistä vaikutusta silmukointiin/polymorfismi
<i>KCNQ1</i>	c.1794+32G>T	0/4	raportoitu	rs41282928	0.035	ei todennäköistä vaikutusta silmukointiin/polymorfismi; silmukointikohta ja proteiinin ominaisuudet voivat muuttua
<i>KCNQ1</i>	c.1638G>A p.(Ser546=)	6/3	raportoitu	rs1057128	0.20	ei todennäköistä vaikutusta silmukointiin/silmukointikohta ja proteiinin ominaisuudet voivat muuttua
<i>KCNQ1</i>	c.1986C>T p.(Tyr662=)	0/18	raportoitu	rs11601907	0.17	mahdollinen silmukoinnin muutos/polymorfismi; silmukointikohta ja proteiinin ominaisuudet voivat muuttua
<i>KCNE2</i>	c.22A>G p.(Thr8Ala)	0/2	raportoitu	rs2234916	0.0038	sairautta aiheuttava; aminohappoketju, silmukointikohta ja proteiinin ominaisuudet voivat muuttua/ todennäköisesti haitallinen/haitallinen ^e

a) hom/het: homotsygoottisena/heterotsygoottisena

b) esiintyy vähintään kahdessa seuraavista: EVS, ExAC, 1000 Genomes, gnomAD ja dbSNP

c) variantti löytyi vain dbSNP-tietokannasta ilman ilmoitettua frekvenssiä

d) MAF: Minor Allele Frequency, gnomAD-tietokannan yleisen populaation mukaan

e) ennustukset ohjelmissa MutationTaster/Polyphen-2/SIFT

3.1 *KCNQ1*-geenin ennusteiden mukaan harmittomat mutaatiot

Valtaosa *KCNQ1*-geenin löydöksistä oli jo tietokannoissa raportoituja syvällä introneissa sijaitsevia tai koodaavan alueen synonyymisiä muutoksia, jotka eivät ennusteiden mukaan todennäköisesti muuta silmukointia. Variantit c.387-51T>C, c.477+86_88delGG, c.478-24G>A, c.1514+50C>G, c.1514+46A>G, c.1514+18C>T, c.1794+32G>T ja c.1732+43T>C voivat aiheuttaa HSF-analyysin mukaan ESS ("exonic splicing silencer") -kohdan muutoksen tai ESE ("exonic splicing enhancer") -kohdan syntymisen, mutta eivät silti todennäköisesti vaikuta silmukointiin. c.1986C>T, p.(Tyr662=) taas saattaa HSF:n mukaan aiheuttaa ESS-kohdan syntymisen tai ESE-kohdan muutoksen sekä mahdollisen muutoksen silmukointiin. MutationTaster puolestaan ilmoittaa kaikkien edellä mainittujen varianttien olevan polymorfismeja, joilla saattaa olla vaikutusta silmukointiin tai proteiinin ominaisuuksiin. c.781-117A>G, c.781-99A>G, c.1394-14C>T, c.1394-39T>G, c.1590+14T>C, c.1685+36A>G ja c.1638G>A, p.(Ser546=) eivät HSF:n mukaan todennäköisesti vaikuta silmukointiin, ja MutationTasterin mukaan ne ovat polymorfismeja, joista osa (c.781-117A>G, c.1394-14C>T, c.1394-39T>G ja c.1638G>A, p.(Ser546=)) voivat vaikuttaa silmukointiin tai proteiinin ominaisuuksiin. Kaikki introniset ja synonyymiset muutokset oli raportoitu tietokannoissa, joskin 41 potilaalta löytynyt, todennäköisesti harmiton deletio c.477+86_88delGG, löytyi tarkistetuista tietokannoista vain dbSNP:sta ilman ilmoitettua frekvenssiä.

3.2 *KCNE2*-geenin missense-mutaatio

Vain *KCNE2*-geenistä kahdelta potilaalta löytynyt heterotsygoottinen missense-mutaatio c.22A>G, p.(Thr8Ala) oli *in silico* -ennusteiden mukaan haitallinen: MutationTasterin mukaan se on sairautta aiheuttava, sen SIFT-arvo on 0 (haitallinen), ja Polyphen-2-arvo 0,999 (todennäköisesti haitallinen; sensitiivisyys 0,14 ja spesifisyys 0,99). Polyphen-2-ennusteen linjauksen mukaan useiden lajien homologisissa sekvensseissä samassa positiossa on niin ikään treoniini, mikä viittaisi kohdan konservoituneisuuteen (kuva 5). Lisäksi treoniinin ja alaniinin erilaiset kemialliset ominaisuudet viittaisivat muutoksen haitallisuuteen: esimerkiksi, treoniini on hydrofiilinen, kun taas alaniini on hydrofobinen, ja treoniini on myös molekyylipainoltaan alaniinia suurempi. SIFT-ennusteen mukaan taas kaikista mahdollisista aminohapoista samassa positiossa vain treoniini olisi siedetty (kuva 6). The Universal Protein Resource- eli UniProt-tietokannan (<http://www.uniprot.org/>) mukaan kuitenkin samassa positiossa voi esiintyä ainakin yksi toinen mahdollinen muutos, Thr8Ile, joten positiossa saatetaan sietää jonkin verran vaihtelua (UniProt Consortium T, 2018).

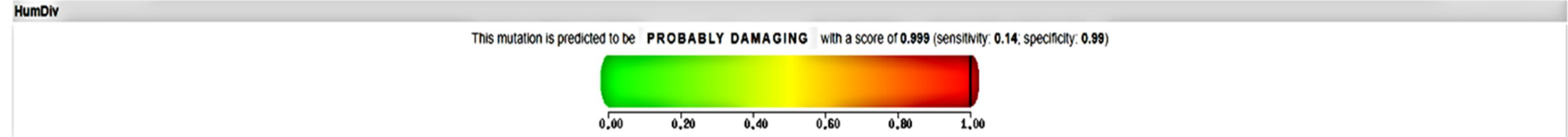
p.(Thr8Ala) -mutaation frekvenssi on gnomAD-tietokannan mukaan 0,38%, ja se on raportoitu sekä homo- että heterotsygoottisena. Potilaiden joukossa variantin frekvenssi oli 2,2%. Fisherin testin mukaan alleelifrekvensseissä on merkittävä ero potilas- ja gnomAD:n kontrolliryhmien välillä ($P=0.0455$; gnomAD:n kontrolliryhmässä alleeleita oli kaikkiaan 277196, joista mutaatiota kantoi 1040; tämän työn potilassarjassa vastaavat luvut olivat 90 ja 2). Samoilla arvoilla suoritettu tilastollisen merkittävyyden testi antoi tuloksiksi $OR=6,0349$; 95% CI: 1,4839-24,5440; $P=0,0120$. KCNE2-proteiinissa on kolme domeenia: solukalvon ulkopuolella oleva N-terminaalinen domeeni, solukalvon sisällä oleva transmembraaninen domeeni sekä soluliman sisäinen C-terminaalinen domeeni, jotka ovat kaikki päärakenteeltaan α -helixejä ja noudattelevat siten aminohappoketjun helixien rajoja (Li ym., 2014; Abbott ym., 2008). Löytynyt p.(Thr8Ala) -mutaatio sijaitsee aminohappoketjun ensimmäisessä α -helixissä N-terminaalisessa domeenissa, jolla saattaa olla vaikutusta KCNQ1:n ilmenemiseen solukalvolla sekä KCNQ1:n ja KCNE2:n muodostaman kaliumkanavan ominaisuuksiin (Li ym., 2014; Abbott ym., 2008). Muutoksen sijainti KCNE2-proteiinissa on esitetty kuvassa 7.

PolyPhen-2 report for Q9Y6J6 T8A (rs2234916)

Protein Acc	Position	AA ₁	AA ₂	Description
Q9Y6J6	8	T	A	Canonical, RecName: Full=Potassium voltage-gated channel subfamily E member 2; AltName: Full=MinK-related peptide 1; AltName: Full=Minimum potassium ion channel-related peptide 1; AltName: Full=Potassium channel subunit beta MiRP1; Length: 123

Results

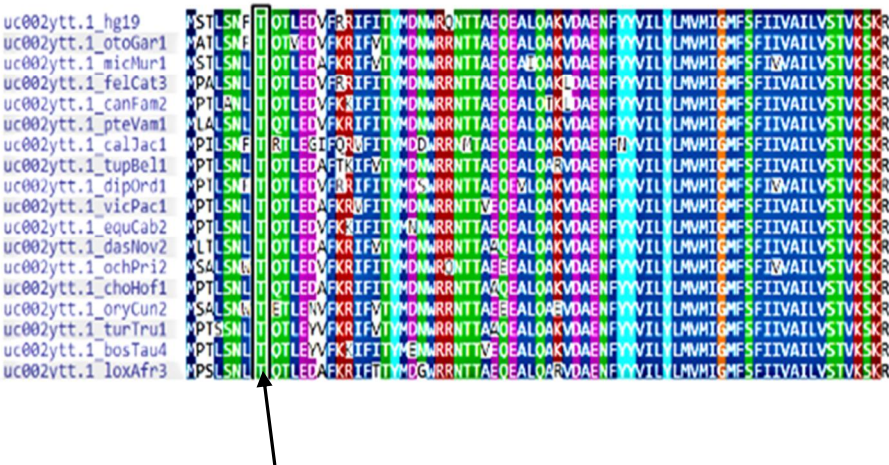
Prediction/Confidence PolyPhen-2 v2.2.2r398



HumVar

Details

Multiple sequence alignment UCSC MultiZ46Way GRCh37/hg19 (08-Oct-2009)

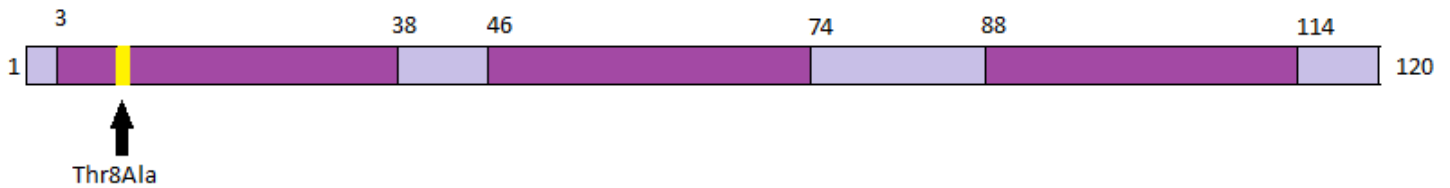


Kuva 5. Polyphen-2-ohjelman ennustuksen tulos *KCNE2*-geenin c.22A>G, p.(Thr8Ala) –mutaatiolle. Ennustuksen mukaan mutaatio on todennäköisesti haitallinen tuloksella 0.999 (sensitiivisyys 0.14, spesifisyys 0.99). Linjaus eri lajien homologisten sekvenssien kanssa osoittaa position olevan konservoitunut ja treoniinin siinä vallitseva aminohappo. Positio on osoitettu nuolella ja kehystetty mustalla.

SIFT: PREDICTIONS

User Input	ENSP	Pos	Ref	Subst	Prediction	SIFT Score	Median Information Content	# Seqs
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	A	*DAMAGING 0		3.66	19
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	C	*DAMAGING 0		3.66	19
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	D	*DAMAGING 0		3.66	19
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	E	*DAMAGING 0		3.66	19
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	F	*DAMAGING 0		3.66	19
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	G	*DAMAGING 0		3.66	19
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	H	*DAMAGING 0		3.66	19
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	I	*DAMAGING 0		3.66	19
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	K	*DAMAGING 0		3.66	19
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	L	*DAMAGING 0		3.66	19
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	M	*DAMAGING 0		3.66	19
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	N	*DAMAGING 0		3.66	19
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	P	*DAMAGING 0		3.66	19
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	Q	*DAMAGING 0		3.66	19
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	R	*DAMAGING 0		3.66	19
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	S	*DAMAGING 0		3.66	19
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	T	TOLERATED 1		3.66	19
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	V	*DAMAGING 0		3.66	19
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	W	*DAMAGING 0		3.66	19
ENSP00000290310,8	ENSP00000290310	8	T	Y	*DAMAGING 0		3.66	19

Kuva 6. SIFT-ohjelman ennustuksen tulos *KCNE2*-geenin c.22A>G, p.(Thr8Ala) –mutaatiolle sekä kaikille mahdollisille aminohapoille samassa positiossa. Ennustuksen mukaan ainoastaan treoniini (T) olisi positiossa siedetty. User Input: ohjelmalle annetut *KCNE2*:n ENSP-koodi (myös sarakkeessa ENSP) sekä positio (8). Pos: positio, Ref: referenssiaminohappo, Subst: aminohapposubstituutio, Prediction: ennuste (damaging: haitallinen, tolerated: siedetty), SIFT Score: SIFT-arvo.



Kuva 7. KCNE2-proteiinin aminohappoketju ja p.(Thr8Ala) –muutoksen sijainti. α -helixit on merkitty purppuralla ja niiden väliset aminohapot laventelilla. N-terminaalisen domeenin α -helix on kuvassa ensimmäinen purppura palkki vasemmalta, transmembraanisen domeenin α -helix keskimmäinen ja C-terminaalisen domeenin oikeanpuoleinen. Kuva on piirretty UniProt-tietokannan perusteella.

4 Pohdinta

4.1 Tulosten tarkastelu

Tämän työn tarkoituksena oli selvittää, voiko joukolta akromegaliapotilaita löytyä perinnöllisiä *KCNQ1*- ja *KCNE2*-geenien virheitä. Etsin harvinaisia ja haitallisia ituradan mutaatioita *KCNQ1*- ja *KCNE2*-geeneistä, sillä kiinnostavaa oli, voisivatko mutaatiot näissä geeneissä mahdollisesti johtaa kasvuhormonivajeen, kuten ryhmämme alkuperäisessä tutkimuksessa oli huomattu, lisäksi kasvuhormonin liialliseen eritykseen. Yksikään *KCNQ1*:stä löytynyt muutos ei todennäköisesti ollut haitallinen, eikä *KCNE2*:sta löytyneen missense-mutaationkaan yhteydestä somatotropinoomien kehittymiseen löytynyt varmoja todisteita.

4.2 *KCNQ1*

KCNQ1-geenistä löytyi useita melko syvällä introneissa sijaitsevia muutoksia sekä kaksi synonyymistä varianttia. *In silico* –ennusteiden mukaan mikään näistä muutoksista ei todennäköisesti vaikuta silmukointiin, ja suurin osa niistä on melko yleisiä. Ainoa poikkeus oli introninen deleetio c.477+86_88delGG, joka oli raportoitu vain dbSNP-tietokannassa ilman frekvenssiä. Se kuitenkin löytyi 41:ltä potilaalta 45:stä, mikä tukee sen *in silico* ennustettua harmittomuutta.

On esitetty, että yli 0,05:n frekvenssi riittäisi yksinään takaamaan variantin harmittomuuden (Richards ym., 2015). Lisäksi on arvioitu karkeasti, että autosomaalisesti dominantisti periytyvien sairauksien tautimutaatioiden frekvenssit ovat yleensä pienempiä kuin taudin insidenssi populaatiossa (akromegalian insidenssi on Lavrentakin ja kollegoiden mukaan 0,2 – 1,1/100 000 eli 0,000002–0,000011) ja vastaavasti autosomaalisesti resessiivisesti periytyvien sairauksien tautimutaatioiden heterotsygoottisten frekvenssien pitäisi olla sairauksien insidenssien luokkaa (Richards ym., 2015;

Lavrentaki ym., 2017). Vaikka vielä ei tiedetäkään, voivatko *KCNQ1*:n tai sen alayksiköitä koodaavien geenien mutaatiot ylipäättään aiheuttaa somatotropinoomien muodostumista ja akromegaliaa, saati millainen mahdollisten tautimutaatioiden periytymistapa olisi, kaikki tässä työssä löydetty variantit olisivat frekvenssiensä perusteella hyvin epätodennäköisiä tautimutaatioehdokkaita.

Kirjallisuudesta löytyvä tietokaan ei anna juuri tukea varianttien haitallisuudelle. Varianttien c.387-51T>C, c.478-24G>A, c.781-117A>G, c.781-99A>G, c.1514+50C>G, c.1794+32G>T, c.477+86_88delGG ja c.1394-14C>T mahdollisista kytköksistä sairauksiin ei ole kirjoittamishetkellä aiemmin ilmestyneitä julkaisuja. Variantteja c.1394-39T>G, c.1685+36A>G, c.1514+46A>G on hyödynnetty kromosomin 11p15 leimautuneen alueen, jolla *KCNQ1*-geeni sijaitsee, metylaation, rakennepoikkeamien ja rekombinaation tutkimuksissa, mutta niillä ei ole ollut merkitystä mahdollisesti tutkittujen tautien olemassaolon kannalta (Alders ym., 2009; Chiesa ym., 2012; Sandovici ym., 2006). Variantit c.1514+18C>T ja c.1590+14T>C taas on löydetty sekä terveiltä että pitkä-QT-potilailta, eikä niillä ole löydetty merkittävää yhteyttä QT-intervallin pituuteen (Gouas ym., 2005; Paulussen ym., 2004; Liu ym., 2002). c.1986C>T, p.(Tyr662=) on niin ikään osoittautunut pitkä-QT-oireyhtymään liittyvissä tutkimuksissa harmittomaksi (Gouas ym., 2005; Paulussen ym., 2004; Amin ym., 2012). Variantin c.1732+43T>C puolestaan on vahvistettu liittyvän krooniseen munuaistautiin genomilaajuisessa assosiaatiotutkimuksessa, johon liittyvissä seeprakalakokeissa löytyi myös yhteys *kcnq1*:n ja munuaisongelmien välillä (Liu ym., 2011). Variantin c.1638G>A p.(Ser546=) on kirjallisuudessa raportoitu olevan harmiton sekä liittyvän assosiaatiotutkimusten perusteella tyypin 2 diabetekseen, eteisvärinän riskiin ja veren triglyseridipitoisuuteen (Gouas ym., 2005; Paulussen ym., 2004; Sun ym., 2016; Li ym., 2015; Chen ym., 2012). Leimautumista tutkittaessa sitä on myös käytetty markkerina (Frost ym., 2010a; Frost ym., 2010b).

Kv-tyypin kaliumkanavia, joiden rakenneosa myös *KCNQ1* on, esiintyy useissa aivolisäkkeen erittävissä soluissa (Chen ym., 2000; Stojilkovic ym., 2010). Kalium- ja kalsiumkanavien toiminta mahdollistaa hormonierityksessä tarvittavan aktiopotentialin syntymisen: Kasvuhormonin erittymistä edeltää kalsiumkanavien avautuminen cAMP/PKA-välitteisesti, kalsiumionien virtaaminen solun sisään sekä kaliumkanavien sulkeutuminen (Chen ym., 2000). Kalsiumionien ylimäärä aiheuttaa solussa depolarisaation ja käynnistää lopulta eksosytoosin. GHRH saa aikaan kalsiumkanavien aukeamisen ja depolarisaation, ja vastaavasti sama hormoni sulkee kaliumkanavia proteiinikinaasi C (PKC) -välitteisesti (Chen ym., 2000; Stojilkovic ym., 2010). Somatostatiini

puolestaan aiheuttaa hyperpolarisaation ja kaliumkanavien aukeamisen, jolloin hormonieritys estyy (Theodoropoulou & Stalla, 2013).

KCNQ1:llä vaikuttaisi ainakin kaliumkanavaominaisuutensa perusteella olevan ilmeisempi yhteys hormonierityksen estämiseen kuin kiihdyttämiseen. Vaikka onkin mahdollista, että *KCNQ1* osallistuisi aivolisäkkeen kasvainten muodostumiseen Wnt-signaalireitin ja/tai epiteelimesenkymaalisen transition kautta, tähän mennessä tunnetuissa tapauksissa usein cAMP-välitteinen viestintä on muuttunut somatotropinoomien muodostumiselle altistavien periytyvien geenivirheiden seurauksena. Esimerkiksi *GNAS*, *AIP*, *PRKARIA* ja *GPR101* osallistuvat kaikki johonkin cAMP-viestinnän vaiheeseen. Paitsi että cAMP osallistuu aktiopotentialin syntyyn, se myös kiihdyttää kasvuhormonin tuotantoa sekä somatotrooppien jakautumista (Ringel ym., 1996; Rosenberg ym., 2006). Ottaen huomioon, ettei KCNQ1:llä ole ainakaan toistaiseksi tiedossa olevaa yhteyttä cAMP-viestintään, KCNQ1:n yhteys somatotropinoomien syntyyn ei sikäli vaikuta ilmeiseltä.

4.3 *KCNE2*

KCNE2:sta löytyi yksi heterotsygoottinen missense-mutaatio, c.22A>G, p.(Thr8Ala), kahdelta potilaalta. *In silico* –ennusteiden mukaan muutos olisi haitallinen ja sijaitisi konservoituneessa aminohappopositiossa, jossa ei siedetä paljon vaihtelua. Lisäksi se esiintyy gnomAD:n tietokannan mukaan yleisessä populaatiossa frekvenssillä 0.0038 ja tämän tutkimuksen potilaiden joukossa frekvenssillä 0.022. Näiden frekvenssien ero saavutti tilastollisen merkittävyyden ($P < 0.05$). Tukea muutoksen haitallisuudelle löytyy jonkin verran myös kirjallisuudesta: *KCNE2*-proteiinin N-terminaalissa domeenissa on aiemmin havaittu sydänvikoihin liitettyjä mutaatioita, ja p.(Thr8Ala) -muutos on liitetty synnynnäisen tai lääkkeiden vaikutuksesta kehittyvän pitkän QT –oireyhtymän riskiin (Abbott ym., 2008; Sesti ym., 2000; Jongbloed ym., 2002; Paulussen ym., 2004; Arnestad ym., 2007).

Toisaalta, terveilläkin henkilöillä voi olla sairautta aiheuttavia geenivirheitä myös tunnetuissa tautigeeneissä, ja *in silico* –ennusteet voivat osittain siitä syystä ennustaa väärin virheiden todelliset vaikutukset (MacArthur ym., 2014). Lisäksi monissa sovelluksissa ennustusten yksi kriteeri on position konservoituneisuus: SIFT-ennusteen mukaan *KCNE2*:n p.8-positiossa ainoa siedetty aminohappo olisi treoniini, ja Polyphen-2-ennusteen mukaan treoniini olisi useimmilla lajeilla tässä positiossa konservoitunut. Toisaalta konservoituneisuus voi joskus olla sattumaa eikä valintapaineen aiheuttamaa (MacArthur ym., 2014). Lisäksi c.22A>G, p.(Thr8Ala) on aiemmissa tutkimuksissa löytynyt myös terveiltä, ja mutaation rikastumiseen potilassarjassa viittaava tilastollinen merkittävyys

voi johtua vain sattumasta ja potilassarjan pienestä koosta (Larsen ym., 2001; Ackerman ym., 2003; Aydin ym., 2005; Mank-Seymour ym., 2006). Huolimatta *KCNE2*:n tärkeydestä useiden epiteelisolujen jakautumisessa ja eritystoiminnassa, tämän työn tulosten ja tähän mennessä ilmestyneiden julkaisujen perusteella ei kuitenkaan voida vielä sanoa, ovatko *KCNE2*-geenin mutaatiot merkittäviä myös somatotropinoomien muodostumisessa.

4.4 Rajoitukset ja ongelmakohdat

Ensimmäiset rajoittavat tekijät tässä työssä olivat potilasnäytteiden määrä ja kirjoittajan tiedot heistä. Vaikka 45 potilaan aineisto onkin kansainvälisen vertailun kestävä ja merkittävän kokoinen akromegalian harvinaisuuteen nähden, näytteiden lukumäärä vaikuttaa tulosten tilastolliseen merkittävyyteen. Nykyistä suurempi aineisto olisi antanut laajemman käsityksen geenien muutosten esiintyvyydestä potilaiden joukossa tietokantojen esiintyvyyksiin verrattuna, varsinkin ottaen huomioon, ettei tässä työssä löytyneiden muutosten haitallisuudesta potilaille *in silico* –ennusteiden ja kirjallisuuden perusteella voi sanoa mitään varmaa. Minulla ei myöskään ollut kaikkea tietoa potilaiden fenotyypeistä ja olisivatko esimerkiksi kasvainten koot tai muut akromegalian fenotyyppiin liittyvät ominaisuudet eronneet *KCNE2*:n mutaatioiden kantajien ja ei-kantajien välillä. Toisaalta, potilaita hoitaneen lääkärin mukaan *KCNE2*-mutaation kantajat edustivat klassista akromegaliaa, heidän kasvaimissaan ei ollut poikkeavuuksia ja heidän QT-aikansa olivat normaalit, mikä lienee riittävästi tietoa tämän työn näkökulmasta (Karhu, 2018).

Toinen ongelma liittyy *KCNQ1*:n ja sen alayksiköiden sekä kasvuhormonin tuotannon yhteyden uutuuteen: Vielä ei tiedetä, millä mekanismilla viallinen *KCNQ1*-proteiini estää kasvuhormonin tuotantoa eikä voida varmasti päätellä, voiko mekanismi liittyä jotenkin myös somatotrooppien jakautumiseen ja kasvuhormonin liialliseen tuotantoon. Vaikka tässä työssä olisikin löytynyt tietokannoissa raportoimattomia ja haitallisia mutaatioita, olisi vielä tarvittu toiminnallisia kokeita niiden merkityksen vahvistamiseksi nimenomaan kasvuhormonin tuotannon kannalta. Tähän mennessä löydettyillä, akromegaliaa aiheuttavilla perinnöllisillä geenivirheillä on useita periytymismalleja, ja jos *KCNQ1*:ssä tai *KCNE2*:ssa voikin esiintyä sairautta aiheuttavia virheitä, löydösten tulkintaa vaikeuttaisi mahdollisen periytymismallin tuntemattomuus. Jos tauti esimerkiksi periytyy resessiivisesti, löytyneet variantit saattavat olla heterotsygoottisina merkityksettömiä, ja dominantissa periytymistavassa taas penetranssi ei välttämättä ole täydellinen. Lisäksi *KCNQ1*:n tapauksessa mahdollisen periytymismallin arvioimista hankaloittaa geenin leimautuminen, jolloin peritty variantti ei välttämättä ilmene lainkaan tai sitten se yksinomaan ilmenee tietyissä kudoksissa.

Kolmas rajoite olikin, ettei tässä työssä ollut mahdollista tutkia, oliko *KCNQ1*:n ilmeneminen potilailla kenties muuttunut, sillä jotkin *KCNQ1*:n introniset variantit on liitetty leimautumisen häiriöistä johtuviin sairauksiin (Alders ym., 2009; Chiesa ym., 2012; Demars ym., 2014). Toisaalta perittyjen 11p15-alueen ilmenemisen ongelmien tiedetään liittyvän vahvasti Silver-Russellin ja Beckwith-Wiedemannin oireyhtymiin, jotka ovat aivan eri sairauksia kuin akromegalia. Neljäs rajoittava tekijä oli, ettei tässä työssä ollut mahdollisuutta tutkia somaattisia mutaatioita ja/tai geenien ilmenemistä kasvaimissa, mikä olisi voinut auttaa valaisemaan *KCNQ1*:n ja *KCNE2*:n mahdollista osallisuutta somatotropinoomien toiminnassa. Toisaalta, yhden tutkielman potilassarjaan kuulumattoman potilaan osalta vertailtiin toisaalla (ks. liite) c.22A>G, p.(Thr8Ala) –mutaation ilmenemistä kasvain- ja normaaleissa kudoksissa. Ilmenemisen eroja ei löytynyt kudosten välillä eikä siis esimerkiksi heterotsygotian menetystä kasvaimessa ollut tapahtunut. Transgeenisten solumallien tutkiminen olisi voinut olla mielenkiintoista, mutta koska tutkielman tulokset eivät vakuuttaneet löytyneiden mutaatioiden haitallisuudesta, solukokeet olisivat tuskin olleet kannattavia vaivaan ja kustannuksiin nähden.

In silico –menetelmät ovat aina suuntaa-antavia, eivätkä niiden ennustukset välttämättä vastaa varianttien vaikutuksia tosielämässä. Next generation sequencing (NGS) –menetelmillä on lukuisia etuja Sanger-sekvensointiin nähden: Niiden avulla voidaan havaita myös PCR:llä monistettavien alueiden ulkopuolelle jääviä intronisia variantteja, geenien kopiolukujen muutoksia sekä deleetioita tai insertioita, joita Sanger-sekvensoinnilla ei nähdä. NGS-menetelmillä voidaan myös tutkia useita geenejä samanaikaisesti. Toisaalta, Sanger-sekvensointi lieenee kustannustehokkain ja riittävän tarkka menetelmä sekvenssimuutosten löytämiseksi, kun tutkitaan vain kahta geeniä homogeenisestä näytteestä (verestä) eristetystä DNA:sta. gnomAD-tietokanta toimii mutaatioiden yleisyyden vertailussa hyvin, sillä se on varsinkin eurooppalaisten osalta kattava sisältäen 123 136 ihmisen eksomit ja 15 496 genomien sekvenssit, vaikkakaan tietoa näytteiden antajien fenotyypeistä eikä siten varmuutta heidän terveydestään verrattuna potilaisiin ole (gnomAD-tietokannan verkkosivu: <http://gnomad.broadinstitute.org/>). Jotta taas intronisten mutaatioiden vaikutuksesta silmukointiin olisi voinut varmistua, potilaiden cDNA:n tutkimista olisi tarvittu, mutta cDNA:n tutkiminen ei ollut työn puitteissa mahdollista.

4.5 Johtopäätökset

Tämä työ oli ensimmäinen yritys tutkia, voivatko periytyvät *KCNQ1*:n ja *KCNE2*:n mutaatiot johtaa somatotropinooman muodostumiseen ja kasvuhormonin liikatuotantoon. Tulosten perusteella ei

voida vielä varmasti sanoa, onko näiden geenien mutaatioilla ja somatotropinoomilla yhteys, ja jos onkin, mutaatiot näissä geneeissä eivät todennäköisesti ole kovin yleisiä kasvainten aiheuttajia. Teoriassa on edelleen mahdollista, että *KCNQ1* ja *KCNE2* osallistuisivat kasvuhormonin liikatuotantoon Wnt/ β -kateniinisignaalointia ja/tai E-kadheriinin solunsisäistä jakautumista sekä epiteeli-mesenkymaalista transitiota säätelevinä tuumorisuppressorigeeneinä. Tulevaisuudessa sekä ituradan että somaattisten mutaatioiden etsimistä suuremmilta potilassarjoilta tarvitaan varmempien johtopäätöksiä tekemiseksi, kuin tämän tutkielman tulosten perusteella on mahdollista tehdä. Koska *KCNQ1*:n ja sen alaysiköiden tehtävät kasvuhormonin tuotannossa ylipäätään ovat vielä tuntemattomia, toiminnalliset kokeet esimerkiksi solumalleilla ovat myös välttämättömiä näiden proteiinien normaalin toiminnan ja mahdollisten tautimekanismien selvittämiseksi.

4.6 Tutkimuksen jatko

Ryhmän mielenkiinto kohdistunee pääasiassa kahden, tätä tutkielmaa edeltäneessä tutkimuksessa löydettyjen, *KCNQ1*:n pistemutaatioiden sekä kasvuhormonivajeen välisen yhteyden tutkimiseen. Polttopisteessä on saada selville erilaistuneiden ja kantasoluissa tehtävien kokeiden avulla mekanismi, jolla löytyneet mutaatiot muuttavat kasvuhormonin normaalia erityistä. Solukokeita saattavat seurata hiirimallit. Jatkotutkimusten tulokset myös valaissevat osaltaan, miten todennäköistä *KCNQ1*:n ja *KCNE2*:n osallistuminen kasvuhormonin liikatuotantoon on. Saattaa myös olla, että palaan *KCNQ1*:n ja *KCNE2*:n pariin jatko-opinnoissa.

5 Liitteet

Suurimmalta osalta tämän työn tuloksiin perustuva artikkeli on julkaistu *Endocrine Connections* –lehdessä: <http://dx.doi.org/10.1530/EC-18-0123>.

6 Kiitokset

Erityisesti haluan kiittää FT Johanna Käsäkoskea paitsi projektini ohjaamisesta myös kärsivällisestä opettamisesta silloin, kun pro gradu oli vielä kaukainen haave. Osoitan kiitokset myös professori Taneli Raiviolle mielenkiintoisesta projektista ja johdattamisesta tutkimuksen maailmaan. Kiitokset hyvästä ryhmähengestä kuuluvat Kirsille, Idalle, Carinalle, Kristiinalle, Annikalle ja Ramille sekä virkistävästä teestä Clipperille, Mokkaestareille ja Nordqvistille (ja lukuisille muille teebrändeille, joiden tuotteita kirjoittamisessa kului runsaasti).

7 Kirjallisuus

1000 Genomes Project Consortium (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature* 526(7571): 68-74.

Abad V, Meyers JL, Weise M, Gafni RI, Barnes KM, Nilsson O, Bacher JD & Baron J (2002). The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology* 143(5): 1851-1857.

Abbott GW (2014). Biology of the KCNQ1 potassium channel. *New Journal of Science* 2014: 237431.

Abbott G (2015). The KCNE2 K⁺ channel regulatory subunit: Ubiquitous influence, complex pathobiology. *Gene* 569(2): 162-172.

Abbott GW, Ramesh B, Srai SK (2008). Secondary structure of the MiRP1 (KCNE2) potassium channel ancillary subunit. *Protein & Peptide Letters* 15(1): 63-75.

Abbott GW & Roepke TK (2016). KCNE2 and gastric cancer: bench to bedside. *Oncotarget* 7(14): 17286 – 17287.

Ackerman MJ, Tester DJ, Jones GS, Will ML, Burrow CR & Curran ME (2003). Ethnic differences in cardiac potassium channel variants: implications for genetic susceptibility to sudden cardiac death and genetic testing for congenital long QT syndrome. *Mayo Clinic Proceedings* 78(12): 1479-1487.

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS & Sunyaev SR (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods* 7(4):248-249.

Alders M, Blik J, vd Lip K, vd Bogaard R & Mannens M (2009). Determination of KCNQ1OT1 and H19 methylation levels in BWS and SRS patients using methylation-sensitive high-resolution melting analysis. *European Journal of Human Genetics* 17(4): 467-473.

Alrezk R, Hannah-Shmouni F & Stratakis CA (2017). MEN4 and CDKN1B mutations: the latest of the MEN syndromes. *Endocrine-Related Cancer* 24(10): T195-T208.

Amin AS, Giudicessi JR, Tijssen AJ, Spanjaart AM, Reckman YJ, Klemens CA, Tanck MW, Kapplinger JD, Hofman N, Sinner MF, Müller M, Wijnen WJ, Tan HL, Bezzina CR, Creemers EE, Wilde AA, Ackerman MJ & Pinto YM (2012). Variants in the 3' untranslated region of the KCNQ1-encoded Kv7.1 potassium channel modify disease severity in patients with type 1 long QT syndrome in an allele-specific manner. *European Heart Journal* 33(6): 714-723.

Arafah B & Nasrallah M (2001). Pituitary tumors: pathophysiology, clinical manifestations and management. *Endocrine-Related Cancer* 8(4): 287-305.

Arnestad M, Crotti L, Rognum TO, Insolia R, Pedrazzini M, Ferrandi C, Vege A, Wang DW, Rhodes TE, George AL Jr & Schwartz PJ (2007). Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome. *Circulation* 115(3): 361-367.

Asa SL & Ezzat S (2009). The pathogenesis of pituitary tumors. *Annual Review of Pathology* 4: 97-126.

Aydin A, Bähring S, Dahm S, Guenther UP, Uhlmann R, Busjahn A & Luft FC (2005). Single nucleotide polymorphism map of five long-QT genes. *Journal of Molecular Medicine (Berl)* 83(2): 159-165.

Ayuk J & Sheppard MC (2006). Growth hormone and its disorders. *Postgraduate Medical Journal* 82(963): 24-30.

Balogh K, Rácz K, Patócs A & Hunyady L (2006). Menin and its interacting proteins: Elucidation of menin function. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 17(9): 357-364.

Balthasar N, Mery PF, Magoulas CB, Mathers KE, Martin A, Mollard P & Robinson IC (2003). Growth hormone-releasing hormone (GHRH) neurons in GHRH-enhanced green fluorescent protein transgenic mice: a ventral hypothalamic network. *Endocrinology* 144(6): 2728-2740.

Batty GD, Shipley MJ, Gunnell D, Huxley R, Kivimäki M, Woodward M, Lee CM & Smith GD (2009). Height, wealth, and health: an overview with new data from three longitudinal studies. *Economics and Human Biology* 7: 137–152.

Beckers A, Lodish MB, Trivellin G, Rostomyan L, Lee M, Faucz FR, Yuan B, Choong CS, Caberg JH, Verrua E, Naves LA, Cheetham TD, Young J, Lysy PA, Petrossians P, Cotterill A, Shah NS, Metzger D, Castermans E, Ambrosio MR, Villa C, Strebkova N, Mazerkina N, Gaillard S, Barra GB, Casulari LA, Neggers SJ, Salvatori R, Jaffrain-Rea ML, Zacharin M, Santamaria BL, Zacharieva S, Lim EM, Mantovani G, Zatelli MC, Collins MT, Bonneville JF, Quezado M, Chittiboina P, Oldfield EH, Bours V, Liu P, W de Herder W, Pellegata N, Lupski JR, Daly AF & Stratakis CA (2015). X-linked acroigantism syndrome: clinical profile and therapeutic responses. *Endocrine-Related Cancer* 22(3): 353-367.

Bertherat J, Horvath A, Groussin L, Grabar S, Boikos S, Cazabat L, Libe R, René-Corail F, Stergiopoulos S, Bourdeau I, Bei T, Clauser E, Calender A, Kirschner LS, Bertagna X, Carney JA & Stratakis CA (2009). Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): Phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94(6): 2085–2091.

Borriello A, Cucciolla V, Oliva A, Zappia V & Ragione F (2007). p27Kip1 Metabolism: A fascinating labyrinth. *Cell Cycle* 6(9): 1053-1061.

Bossis I & Stratakis CA (2004). Minireview: PRKAR1A: Normal and Abnormal Functions. *Endocrinology* 145(12): 5452–5458.

Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, Conte-Devolx B, Falchetti A, Gheri RG, Libroia A, Lips JM, Lombardi G, Mannelli M, Pacini F, Ponder B, Raue F, Skogseid B, Tamburrano G, Thakker R, Thompson N, Tomassetti P, Tonelli F, Wells S & Marx Jr S (2001). CONSENSUS: guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86: 5658–5671.

Carter-Su C, Schwartz J & Argetsinger LS (2016). Growth hormone signaling pathways. *Growth Hormone & IGF Research* 28: 11-15.

Chen C, Xu R, Clarke IJ, Ruan M, Loneragan K, Roh S (2000). Diverse intracellular signalling systems used by growth hormone-releasing hormone in regulating voltage-gated Ca²⁺ or K⁺ channels in pituitary somatotropes. *Immunology and Cell Biology* 78: 356-368.

Chen XD, Yang YJ, Li SY, Peng QQ, Zheng LJ, Jin L & Wang XF (2012). Several polymorphisms of KCNQ1 gene are associated with plasma lipid levels in general Chinese populations. *PLoS One* 7(3): e34229.

Chen YX, Yan J, Keeshan K, Tubbs AT, Wang H, Silva A, Brown EJ, Hess JL, Pear WS & Hua X (2006). The tumor suppressor menin regulates hematopoiesis and myeloid transformation by influencing Hox gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(4): 1018-1023.

Chiche J, Rouleau M, Gounon P, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J & Mazure NM (2010). Hypoxic enlarged mitochondria protect cancer cells from apoptotic stimuli. *Journal of Cellular Physiology* 222: 648–657.

Chiesa N, De Crescenzo A, Mishra K, Perone L, Carella M, Palumbo O, Mussa A, Sparago A, Cerrato F, Russo S, Lapi E, Cubellis MV, Kanduri C, Cirillo Silengo M, Riccio A & Ferrero GB (2012). The KCNQ1OT1 imprinting control region and non-coding RNA: new properties derived from the study of Beckwith-Wiedemann syndrome and Silver-Russell syndrome cases. *Human Molecular Genetics* 21(1): 10-25.

Cohen LE, Hashimoto Y, Zanger K, Wondisford F & Radovick S (1999). CREB-independent regulation by CBP is a novel mechanism of human growth hormone gene expression. *Journal of Clinical Investigation* 104(8):1123-1130.

Colao A, Ferone D, Marzullo P & Lombardi G (2004); Systemic Complications of Acromegaly: Epidemiology, Pathogenesis, and Management. *Endocrine Reviews* 25(1): 102-152.

Daly AF, Jaffrain-Rea ML, Ciccarelli A, Valdes-Socin H, Rohmer V, Tamburrano G, Borson-Chazot C, Estour B, Ciccarelli E, Brue T, Ferolla P, Emy P, Colao A, De Menis E, Lecomte P, Penfornis F, Delemer B, Bertherat J, Wémeau JL, De Herder W, Archambeaud F, Stevenaert A, Calender A, Murat A, Cavagnini F & Beckers A (2006). Clinical characterization of familial isolated pituitary adenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91(9): 3316-3323.

Daly AF, Vanbellinchen JF, Khoo SK, Jaffrain-Rea ML, Naves LA, Guitelman MA, Murat A, Emy P, Gimenez-Roqueplo AP, Tamburrano G, Raverot G, Barlier A, De Herder W, Penfornis A, Ciccarelli E, Estour B, Lecomte P, Gatta B, Chabre O, Sabaté MI, Bertagna X, Garcia Basavilbaso N, Stalldecker G, Colao A, Ferolla P, Wémeau JL, Caron P, Sadoul JL, Oneto A, Archambeaud F, Calender A, Sinilnikova O, Montañana CF, Cavagnini F, Hana V, Solano A, Delettieres D, Luccio-Camelo DC, Basso A, Rohmer V, Brue T, Bours V, Teh BT & Beckers A (2007). Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: analysis in 73 families. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92(5): 1891-1896.

Daly AF, Tichomirowa MA, Petrossians P, Heliövaara E, Jaffrain-Rea ML, Barlier A, Naves LA, Ebeling T, Karhu A, Raappana A, Cazabat L, De Menis E, Montañana CF, Raverot G, Weil RJ, Sane T, Maiter D, Neggers S, Yaneva M, Tabarin A, Verrua E, Eloranta E, Murat A, Vierimaa O, Salmela PI, Emy P, Toledo RA, Sabaté MI, Villa C, Popelier M, Salvatori R, Jennings J, Longás AF, Labarta Aizpún JI, Georgitsi M, Paschke R, Ronchi C, Valimaki M, Saloranta C, De Herder W, Cozzi R,

Guitelman M, Magri F, Lagonigro MS, Halaby G, Corman V, Hagelstein MT, Vanbellinghen JF, Barra GB, Gimenez-Roqueplo AP, Cameron FJ, Borson-Chazot F, Holdaway I, Toledo SP, Stalla GK, Spada A, Zacharieva S, Bertherat J, Brue T, Bours V, Chanson P, Aaltonen LA & Beckers A (2010). Clinical characteristics and therapeutic responses in patients with germ-line AIP mutations and pituitary adenomas: an international collaborative study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95: E373–E383.

DeLellis R, Lloyd R, Heitz P & Eng C (Eds.) (2004). World health organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs, IARC Press, Lyon.

Demars J, Shmela ME, Khan AW, Lee KS, Azzi S, Dehais P, Netchine I, Rossignol S, Le Bouc Y, El-Osta A & Gicquel C (2014). Genetic variants within the second intron of the KCNQ1 gene affect CTCF binding and confer a risk of Beckwith-Wiedemann syndrome upon maternal transmission. *Journal of Medical Genetics* 51(8): 502-511.

Denés J, Swords F, Rattenberry E, Stals K, Owens M, Cranston T, Xekouki P, Moran L, Kumar A, Wassif C, Fersht N, Baldeweg SE, Morris D, Lightman S, Agha A, Rees A, Grieve J, Powell M, Boguszewski CL, Dutta P, Thakker RV, Srirangalingam U, Thompson CJ, Druce M, Higham C, Davis J, Eeles R, Stevenson M, O’Sullivan B, Taniere P, Skordilis K, Gabrovska P, Barlier A, Webb SM, Aulinas A, Drake WM, Bevan JS, Preda C, Dalantaeva N, Ribeiro-Oliveira, Jr A, Tena Garcia I, Yordanova G, Iotova V, Evanson J, Grossman AB, Trouillas J, Ellard S, Stratakis CA, Maher ER, Roncaroli F & Korbonits M (2015). Heterogeneous genetic background of the association of pheochromocytoma/paraganglioma and pituitary adenoma: results from a large patient cohort. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100 (3): E531-E541.

Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M & Beroud C (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Research* 37(9).

Elston MS & Clifton-Bligh RJ (2010). Identification of Wnt family inhibitors: a pituitary tumor directed whole genome approach. *Molecular and Cellular Endocrinology* 326 (1-2): 48-54.

Elston MS, Gill AJ, Conaglen JV, Clarkson A, Shaw JM, Law AJ, Cook RJ, Little NS, Clifton-Bligh RJ, Robinson BG & McDonald KL (2008). Wnt pathway inhibitors are strongly down-regulated in pituitary tumors. *Endocrinology* 149(3): 1235–1242.

Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>); viitattu 2/2018.

Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML & McCutcheon IE (2004). The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer* 101(3): 613-619.

Fernandez-Rodriguez E, Casanueva FF & Bernabeu I (2015). Update on prognostic factors in acromegaly: Is a risk score possible? *Pituitary* 18: 431-440.

Formosa R, Xuereb-Anastasi A & Vassallo J (2013). Aip regulates cAMP signalling and GH secretion in GH3 cells. *Endocrine-Related Cancer* 20: 495-505.

Formosa R & Vassallo J (2017). Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP) N-terminus gene mutations identified in pituitary adenoma patients alter protein stability and function. *Hormones and Cancer* 8(3): 174-184.

Fougner S, Lekva T, Borota O, Hald JK, Bollerslev J & Berg P (2010). The expression of E-cadherin in somatotroph pituitary adenomas is related to tumor size, invasiveness, and somatostatin analog response. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95(5): 2334–2342.

Frost JM, Monk D, Stojilkovic-Mikic T, Woodfine K, Chitty LS, Murrell A, Stanier P & Moore GE (2010a). Evaluation of allelic expression of imprinted genes in adult human blood. *PLoS One* 5(10): e13556.

Frost JM, Udayashankar R, Moore HD & Moore GE (2010b). Telomeric NAP1L4 and OSBPL5 of the KCNQ1 cluster, and the DECORIN gene are not imprinted in human trophoblast stem cells. *PLoS One* 5(7) :e11595.

Gaston-Massuet C, Andoniadou CL, Signore M, Jayakody SA, Charolidi N, Kyeyune R, Vernay B, Jacques TS, Taketo MM, Le Tissier P, Dattani MT & Martinez-Barbera JP. Increased Wingless (Wnt) signaling in pituitary progenitor/stem cells gives rise to pituitary tumors in mice and humans (2011). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(28): 11482-11487.

Giustina A, Mazziotti G & Canalis E (2008). Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocrine Reviews* 29(5): 535-559.

Gouas L, Nicaud V, Berthet M, Forhan A, Tiret L, Balkau B & Guicheney P; D.E.S.I.R. Study Group (2005). Association of KCNQ1, KCNE1, KCNH2 and SCN5A polymorphisms with QTc interval length in a healthy population. *European Journal of Human Genetics* 13(11): 1213-1222.

Hannah-Shmouni F, Trivellin G & Stratakis CA (2016). Genetics of gigantism and acromegaly. *Growth Hormone and IGF Research* 30-31: 37-41.

Hedley PL, Jørgensen P, Schlamowitz S, Wangari R, Moolman-Smook J, Brink PA, Kanters JK, Corfield VA & Christiansen M (2009). The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update. *Human Mutation* 30(11): 1486-1511.

Iacovazzo D, Caswell R, Bunce B, Jose S, Yuan B, Hernández-Ramírez LC, Kapur S, Caimari F, Evanson J, Ferraù F, Dang MN, Gabrovská P, Larkin SJ, Ansorge O, Rodd C, Vance ML, Ramírez-Rentería C, Mercado M, Goldstone AP, Buchfelder M, Burren CP, Gurlek AP, Dutta P, Choong, CS, Cheetham T, Trivellin G, Stratakis CA, Lopes M, Grossman AB, Trouillas J, Lupski JR, Ellard S, Sampson JR, Roncaroli F & Korbonits M (2016). Germline or somatic GPR101 duplication leads to X-linked acrogigantism: a clinico-pathological and genetic study. *Acta Neuropathologica Communications* 4(1): 56.

Jee YH & Baron J (2016). The biology of stature. *The Journal of Pediatrics* 173: 32-38.

Jongbloed R, Marcelis C, Velter C, Doevendans P, Geraedts J & Smeets H (2002). DHPLC analysis of potassium ion channel genes in congenital long QT syndrome. *Human Mutation* 20(5): 382-391.

Karhu, Auli (2018). Suullinen tiedonanto.

Kauppinen-Mäkelin, R (2013). Akromegalia. Suomen endokrinologiyhdistys ry:n [www-sivusto https://www.endo.fi/tietoa-endokrinologisista-sairau/potilasohjeet/akromegalia/](https://www.endo.fi/tietoa-endokrinologisista-sairau/potilasohjeet/akromegalia/) . Viitattu 8.9.2017.

Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, Cho-Chung YS & Stratakis CA (2000). Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I- α regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nature Genetics* 26: 89–92.

Kovacs K, Scheithauer B, Horvath E & Lloyd R (1996). The World Health Organization classification of adenohypophysial neoplasms. A proposed five-tier scheme. *Cancer* 78(3): 502-510.

Kumar P, Henikoff S & Ng PC (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols* 4(7):1073-1081.

Larsen LA, Andersen PS, Kanters J, Svendsen IH, Jacobsen JR, Vuust J, Wettrell G, Tranebjaerg L, Bathen J & Christiansen M (2001). Screening for mutations and polymorphisms in the genes *KCNH2* and *KCNE2* encoding the cardiac *HERG/MiRP1* ion channel: implications for acquired and congenital long Q-T syndrome. *Clinical Chemistry* 47(8): 1390-1395.

Lavrentaki A, Paluzzi A, Wass J & Karavitaki N (2017). Epidemiology of acromegaly: Review of population studies. *Pituitary* 20(1): 4-9.

Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL & Butler A (2001). The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocrine Reviews* 22(1): 53-74.

Le Tissier PR, Carmignac DF, Lilley S, Sesay AK, Phelps CJ, Houston P, Mathers K, Magoulas C, Ogden D & Robinson IC (2005). Hypothalamic growth hormone-releasing hormone (GHRH) deficiency: targeted ablation of GHRH neurons in mice using a viral ion channel transgene. *Molecular Endocrinology* 19(5): 1251–1262.

Lee SM, Baik J, Nguyen D, Nguyen V, Liu S, Hu Z & Abbott GW (2017). *Kcne2* deletion impairs insulin secretion and causes type 2 diabetes mellitus. *The FASEB Journal* 31(6): 2674-2685.

Lee J & Howell J (2006). Tall girls: the social shaping of a medical therapy. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 160: 1035–1039.

Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria AH, Ware JS, Hill AJ, Cummings BB, Tukiainen T, Birnbaum DP, Kosmicki JA, Duncan LE, Estrada K, Zhao F, Zou J, Pierce-Hoffman E, Berghout J, Cooper DN, DeFlaux N, DePristo M, Do R, Flannick J, Fromer M, Gauthier L, Goldstein J, Gupta N, Howrigan D, Kiezun A, Kurki MI, Moonshine AL, Natarajan P, Orozco L, Peloso GM2, Poplin R, Rivas MA, Ruano-Rubio V, Rose SA, Ruderfer DM, Shakir K, Stenson PD, Stevens C, Thomas BP, Tiao G, Tusie-Luna MT, Weisburd B, Won HH, Yu D, Altshuler DM, Ardissino D, Boehnke M, Danesh J, Donnelly S, Elosua R, Florez JC, Gabriel S, Getz G, Glatt SJ, Hultman CM, Kathiresan S, Laakso M, McCarroll S, McCarthy MI, McGovern D, McPherson R, Neale BM, Palotie A1, Purcell SM, Saleheen D, Scharf JM, Sklar P, Sullivan PF, Tuomilehto J, Tsuang MT, Watkins HC, Wilson JG, Daly MJ & MacArthur DG; Exome Aggregation Consortium (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 536 (7616): 285-291.

- Lemos M & Thakker RV (2008). Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Human Mutation* 29: 22–32.
- Li L, Shen C, Yao Z, Liang J & Huang C (2015). Genetic variants of potassium voltage-gated channel genes (KCNQ1, KCNH2, and KCNE1) affected the risk of atrial fibrillation in elderly patients. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 19(7): 359-365.
- Li P, Liu H, Lai C, Sun P, Zeng W, Wu F, Zhang L, Wang S, Tian C & Ding J (2014). Differential modulations of KCNQ1 by auxiliary proteins KCNE1 and KCNE2. *Scientific Reports* 4:4973.
- Liin SI, Barro-Soria R & Larsson HP (2015). The KCNQ1 channel – remarkable flexibility in gating allows for functional versatility. *The Journal of Physiology* 593: 2605-2615.
- Linglart A Maupetit-Méhouas S & Silve C (2013). GNAS-related loss-of-function disorders and the role of imprinting. *Hormone Research in Paediatrics* 79: 119-129.
- Lippa RA (2007). The preferred traits of mates in a cross-national study of heterosexual and homosexual men and women: an examination of biological and cultural influences. *Archives of Sexual Behavior* 36(2): 193-208.
- Liu CT, Garnaas MK, Tin A, Kottgen A, Franceschini N, Peralta CA, de Boer IH, Lu X, Atkinson E, Ding J, Nalls M, Shriener D, Coresh J, Kutlar A, Bibbins-Domingo K, Siscovick D, Akyzbekova E, Wyatt S, Astor B, Mychaleckjy J, Li M, Reilly MP, Townsend RR, Adeyemo A, Zonderman AB, de Andrade M, Turner ST, Mosley TH, Harris TB; CKDGen Consortium, Rotimi CN, Liu Y, Kardia SL, Evans MK, Shlipak MG, Kramer H, Flessner MF, Dreisbach AW, Goessling W, Cupples LA, Kao WL & Fox CS (2011). Genetic association for renal traits among participants of African ancestry reveals new loci for renal function. *PLoS Genetics* 7(9):e1002264.
- Liu W, Yang J, Hu D, Kang C, Li C, Zhang S, Li P, Chen Z, Qin X, Ying K, Li Y, Li Y, Li Z, Cheng X, Li L, Qi Y, Chen S, Wang Q (2002). KCNQ1 and KCNH2 mutations associated with long QT syndrome in a Chinese population. *Human Mutation* 20(6): 475-476.
- Lodish MB, Trivellin G, & Stratakis CA (2016). Pituitary gigantism: update on molecular biology and management. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 23(1): 72–80.
- Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV & Efstratiadis A (2001). Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Developmental Biology* 229(1): 141–162.
- MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP, Rehm HL, Shendure J, Abecasis GR, Adams DR, Altman RB, Antonarakis SE, Ashley EA, Barrett JC, Biesecker LG, Conrad DF, Cooper GM, Cox NJ, Daly MJ, Gerstein MB, Goldstein DB, Hirschhorn JN, Leal SM, Pennacchio LA, Stamatoyannopoulos JA, Sunyaev SR, Valle D, Voight BF, Winckler W & Gunter C (2014). Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature* 508(7497): 469–476.
- Mank-Seymour AR, Richmond JL, Wood LS, Reynolds JM, Fan YT, Warnes GR, Milos PM & Thompson JF (2006). Association of torsades de pointes with novel and known single nucleotide polymorphisms in long QT syndrome genes. *American Heart Journal* 152(6): 1116-1122.

Marques P & Korbonits M (2017). Genetic aspects of pituitary adenomas. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America* 46(2): 335-374.

Marx S (2005). Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nature Reviews Cancer* 5: 367–375.

Murray PG & Clayton PE (2013). Endocrine control of growth. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 163C(2): 76-85.

Pardo L & Stühmer W (2013). The roles of K⁺ channels in cancer. *Nature Reviews Cancer* 14(1): 39.

Paulussen AD, Gilissen RA, Armstrong M, Doevendans PA, Verhasselt P, Smeets HJ, Schulze-Bahr E, Haverkamp W, Breithardt G, Cohen N & Aerssens J (2004). Genetic variations of KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, and KCNE2 in drug-induced long QT syndrome patients. *Journal of Molecular Medicine (Berl)* 82(3): 182-188.

Pincus SM, Gevers EF, Robinson IC, van den Berg G, Roelfsema F, Hartman ML & Veldhuis JD (1996). Females secrete growth hormone with more process irregularity than males in both humans and rats. *American Journal of Physiology* 270: E107-E115.

Pisanski K & Feinberg D (2013). Cross-cultural variation in mate preferences for averageness, symmetry, body size, and masculinity. *Cross-Cultural Research* 47(2): 162-197.

Puche JE & Castilla-Cortázar I (2012). Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency. *Journal of Translational Medicine* 10: 224.

Rapetti-Mauss R, Bustos V, Thomas W, McBryan J, Harvey H, Lajczak N, Madden S, Pellissier B, Borgese F, Soriani O & Harvey BJ (2017). Bidirectional KCNQ1: β -catenin interaction drives colorectal cancer cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(16): 4159–4164.

Ringel MD, Schwindinger WF & Levine MA (1996). Clinical implications of genetic defects in G proteins. The molecular basis of McCune-Albright syndrome and Albright hereditary osteodystrophy. *Medicine (Baltimore)* 75: 171–184.

Roepke TK, Anantharam A, Kirchhoff P, Busque SM, Young JB, Geibel JP, Lerner DJ & Abbott GW (2006). The KCNE2 potassium channel ancillary subunit is essential for gastric acid secretion. *The Journal of Biological Chemistry* 281(33): 23740-23747.

Roepke TK, King EC, Reyna-Neyra A, Paroder M, Purtell K, Koba W, Fine E, Lerner DJ, Carrasco N, Abbott GW (2009). Kcne2 deletion uncovers its crucial role in thyroid hormone biosynthesis. *Nature Medicine* 15(10):1186-1194.

Roepke TK, Purtell K, King EC, La Perle KM, Lerner DJ & Abbott GW (2010). Targeted deletion of Kcne2 causes gastritis cystica profunda and gastric neoplasia. *PLoS One* 5(7):e11451.

Rostomyan, L. Daly AF, Petrossians P, Nachev E, Lila AR, Lecoq AL, Lecumberri B, Trivellin G, Salvatori R, Moraitis AG, Holdaway I, Kranenburg-van Klaveren DJ, Chiara Zatelli M, Palacios N, Nozieres C, Zacharin M, Ebeling T, Ojaniemi M, Rozhinskaya L, Verrua E, Jaffrain-Rea ML, Filipponi S, Gusakova D, Pronin V, Bertherat J, Belaya Z, Ilovayskaya I, Sahnoun-Fathallah M,

Sievers C, Stalla GK, Castermans E, Caberg JH, Sorkina E, Auriemma RS, Mittal S, Kareva M, Lysy PA, Emy P1, De Menis E, Choong CS, Mantovani G, Bours V, De Herder W, Brue T, Barlier A, Neggers S, Zacharieva S, Chanson P, Shah NS, Stratakis CA, Naves LA & Beckers A (2015). Clinical and genetic characterization of pituitary gigantism: An international collaborative study in 208 patients. *Endocrine-Related Cancer* 22(5): 745-757.

Rosenberg D, Groussin L, Jullian E, Perlemoine K, Bertagna X & Bertherat J (2006). Role of the PKA-regulated transcription factor CREB in development and tumorigenesis of endocrine tissues. *Annals of the New York Academy of Sciences* 968: 65-74.

Salenave S, Boyce AM, Collins MT & Chanson P (2014). Acromegaly and McCune-Albright syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99(6): 1955-1969.

Salpea P & Stratakis CA (2014). Carney complex and McCune Albright syndrome: An overview of clinical manifestations and human molecular genetics. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 386(1-2): 85-91.

Sandovici I, Kassovska-Bratinova S, Vaughan JE, Stewart R, Leppert M & Sapienza C (2006). Human imprinted chromosomal regions are historical hot-spots of recombination. *PLoS Genetics* 2(7): e101.

Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M & Seelow D (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature Methods* 11(4): 361-362.

Sesti F, Abbott GW, Wei J, Murray KT, Saksena S, Schwartz PJ, Priori SG, Roden DM, George AL Jr & Goldstein SA (2000). A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(19): 10613-10618.

Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM & Sirotkin K (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Research* 29(1):308-311.

Stojilkovic SS, Tabak J, Bertram R (2010). Ion channels and signaling in the pituitary gland. *Endocrine Reviews* 31(6): 845-915.

Sun X, Sui W, Wang X, Hou X, Ou M, Dai Y & Xiang Y (2016). Whole-genome re-sequencing for the identification of high contribution susceptibility gene variants in patients with type 2 diabetes. *Molecular Medicine Reports* 13(5): 3735-3746.

Svenningsen ÅF & Kanje M (1998). Regulation of Schwann cell proliferation in cultured segments of the adult rat sciatic nerve. *Journal of Neuroscience Research* 52(5): 530-537.

Theodoropoulou M & Stalla GK (2013). Somatostatin receptors: from signaling to clinical practice. *Frontiers in Neuroendocrinology* 34: 228–252.

Tommiska J, Käsäkoski J, Skibsbye L, Vaaralahti K, Liu X, Lodge EJ, Tang C, Yuan L, Fagerholm R, Kanters JG, Lahermo P, Kaunisto M, Keski-Filppula R, Vuoristo S, Pulli K, Ebeling T, Valanne L, Sankila E, Kivirikko S, Lääperi M, Casoni F, Giacobini P, Phan-Hug F, Buki T, Tena-Sempere M, Pitteloud N, Veijola R, Lipsanen-Nyman M, Kaunisto K, Mollard P, Andoniadou CL, Hirsch

JA, Varjosalo M, Jespersen T & Raivio T (2017). Two missense mutations in KCNQ1 cause pituitary hormone deficiency and maternally inherited gingival fibromatosis. *Nature Communications* 8: 1289.

Trivellin G, Daly AF, Faucz FR, Yuan B, Rostomyan L, Larco DO, Schernthaner-Reiter MH, Szarek E, Leal LF, Caberg J, Castermans E, Villa C, Dimop A, Chittiboina PF, Xekouki P, Shah N, Metzger D, Lysy PA, Ferrante E, Strebkova N, Mazerkina N, Zatelli MC, Lodish M, Horvath A, de Alexandre R, Manning AD, Levy I, Keil MF, Palmeira M, Coppieters W, Georges M, D.V.M., Naves LA, Jamar M, Bours V, Wu TJ, Choong CS, Bertherat J, Chanson P, Kamenický P, Farrell WE, Barlier A, Quezado M, Bjelobaba I, Stojilkovic SS, Wess J, Costanzi S, Liu P, Lupski JR, Beckers A & Stratakis CA (2014). Gigantism and acromegaly due to Xq26 microduplications and GPR101 mutation. *The New England Journal of Medicine* 371 (25): 2363-2374.

Tuominen I, Heliövaara E, Raitila A, Rautiainen MR, Mehine M, Katainen R, Donner I, Aittomäki V, Lehtonen HJ, Ahlsten M, Kivipeltö L, Schalin-Jäntti C, Arola J, Hautaniemi S & Karhu A (2015). AIP inactivation leads to pituitary tumorigenesis through defective G α i-cAMP signaling. *Oncogene* 34(9): 1174-1184.

Uchimura T, Hollander JM, Nakamura DS, Liu Z, Rosen CJ, Georgakoudi I & Zeng L (2017). An essential role for IGF2 in cartilage development and glucose metabolism during postnatal long bone growth. *Development* 144(19): 3533-3546.

UniProt Consortium T (2018). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research* 46(5): 269.

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M & Rozen SG (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15): e115.

Vandeva S, Jaffrain-Rea M, Daly A, Tichomirowa M, Zacharieva S & Beckers A (2010). The genetics of pituitary adenomas. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 24(3): 461-476.

Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Salmela P, Paschke R, Gündogdu Sadi, De Menis E, Mäkinen M, Launonen V, Karhu A & Aaltonen L. (2006). Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science*, 312(5777): 1228-1230.

Vortmeyer A, Gläsker S, Mehta G, Abu-Asab M, Smith J, Zhuang Z, Collins M & Oldfield E (2012). Somatic GNAS mutation causes widespread and diffuse pituitary disease in acromegalic patients with McCune-Albright syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97(7): 2404–2413.

Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E & Spiegel AM (1991). Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *The New England Journal of Medicine* 325(24): 1688-1695.

Wood AR & Vitusi M (2014). Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height. *Nature Genetics* 46(11): 1173-1186.

Xekouki P, Pacak K, Almeida M, Wassif CA, Rustin P, Nesterova M, Luz Sierra M, Matro J, Ball E, Azevedo M, Horvath A, Lyssikatos C, Quezado M, Patronas N, Ferrando B, Pasini B, Lytras A,

Tolis G & Stratakis CA (2012). Succinate dehydrogenase (SDH) D subunit (SDHD) inactivation in a growth-hormone-producing pituitary tumor: a new association for SDH? *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97: E357–E366.

Xekouki P, Szarek E, Bullova P, Giubellino A, Quezado M, Mastroyannis SA, Mastorakos P, Wassif CA, Raygada M, Rentia N, Dye L, Cougnoux A, Koziol D, de La Luz Sierra M, Lyssikatos C, Belyavskaya E, Malchoff C, Moline J, Eng C, Maher JL III, Pacak K, Lodish M & Stratakis CA (2015). Pituitary adenoma with paraganglioma/pheochromocytoma (3PAs) and succinate dehydrogenase defects in humans and mice. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100(5)1: E710–E719.

Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, Ooi GT, Setser J, Frystyk J, Boisclair YR & LeRoith D (2002). Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *Journal of Clinical Investigation* 110(6): 771-781.

Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, Billis K, Cummins C, Gall A, Girón CG, Gil L, Gordon L, Haggerty L, Haskell E, Hourlier T, Izuogu OG, Janacek SH, Juettemann T, To JK, Laird MR, Lavidas I, Liu Z, Loveland JE, Maurel T, McLaren W, Moore B, Mudge J, Murphy DN, Newman V, Nuhn M, Ogeh D, Ong CK, Parker A, Patricio M, Riat HS, Schuilenburg H, Sheppard D, Sparrow H, Taylor K, Thormann A, Vullo A, Walts B, Zadissa A, Frankish A, Hunt SE, Kostadima M, Langridge N, Martin FJ, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Staines DM, Trevanion SJ, Aken BL, Cunningham F, Yates A & Flicek P (2018). Ensembl 2018. *Nucleic Acids Research* 46(D1): D754-D761.

Zimmerman D, Young WF, Ebersold MJ, Scheithauer BW, Kovacs K, Horvath E, Whitaker MD, Eberhard, NL, Downs TR & Frohman LA (1993). Congenital gigantism due to growth hormone-releasing hormone excess and pituitary hyperplasia with adenomatous transformation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 76: 216-222.

